

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E**  
**QUÍMICA MEDICINAL**

**EFEITO DAS MIOTOXINAS DO VENENO DE *Bothrops jararacussu*, BOTHROPSTOXINA I E II, SOBRE ATPASES DE TRANSPORTE IÔNICO DO MÚSCULO *EXTENSOR DIGITORUM LONGUS* DE CAMUNDONGOS**

**Rodrigo Ayres de Oliveira**

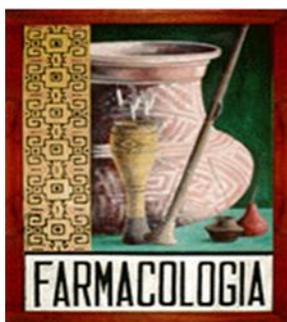
Rio de Janeiro

2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E**  
**QUÍMICA MEDICINAL**

**EFEITO DAS MIOTOXINAS DO VENENO DE *Bothrops jararacussu*, BOTHROPSTOXINA I E II, SOBRE ATPASES DE TRANSPORTE IÔNICO DO MÚSCULO *EXTENSOR DIGITORUM LONGUS* DE CAMUNDONGOS**

**Rodrigo Ayres de Oliveira**



Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia)

Orientadores: Prof. Dr. Luis Eduardo Menezes Quintas  
Prof. Dr. Valéria do Monti Nascimento Cunha (co-orientadora)

Rio de Janeiro

Abril/2013

AYRES, RODRIGO OLIVEIRA

EFEITO DAS MIOTOXINAS DO VENENO DE *Bothrops jararacussu*, BOTHROPSTOXINA I E II, SOBRE ATPASES DE TRANSPORTE IÔNICO DO MÚSCULO *EXTENSOR DIGITORUM LONGUS* DE CAMUNDONGOS./ RODRIGO AYRES DE OLIVEIRA. -RIO DE JANEIRO: UFRJ/ICB, 2013.

XII, 64F.

DISSERTAÇÃO (MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS) – UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E QUÍMICA MEDICINAL, RIO DE JANEIRO, 2013.

ORIENTADORES: LUIS EDUARDO MENEZES QUINTAS E VALÉRIA DO MONTI NASCIMENTO CUNHA

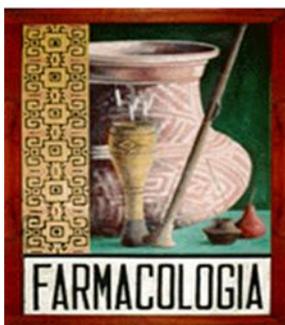
1.  $Na^+,K^+$ -ATPASE. 2.  $Ca^{2+}$ -ATPASE. 3. MIOTOXINAS. 4. *BOTHROPS JARARACUSSU*. 5. DEGENERAÇÃO MUSCULAR. I. QUINTAS, LUIS EDUARDO MENEZES (ORIENT.) E CUNHA, VALERIA MONTE NASCIMENTO (ORIENT.). II. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO. INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS. III. TÍTULO.

**EFEITO DAS MIOTOXINAS DO VENENO DE *Bothrops jararacussu*, BOTHROPSTOXINA I E II, SOBRE ATPASES DE TRANSPORTE IÔNICO DO MÚSCULO *EXTENSOR DIGITORUM LONGUS* DE CAMUNDONGOS**

**Rodrigo Ayres de Oliveira**

**Orientadores: Prof. Dr. Luis Eduardo Menezes Quintas**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valéria do Monti Nascimento Cunha (co-orientadora)**



Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia)

Aprovada por:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Mermelstein

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Josiane Sabadini Neves

---

Prof. Dr. Paulo de Assis Melo

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marília Zaluar Passos Guimarães (revisora)

---

Prof. Dr. Luis Eduardo Menezes Quintas (orientador)

## AGRADECIMENTOS

... ao meu professor e orientador Luis Eduardo Menezes Quintas, deixo aqui registrado o meu mais profundo respeito e gratidão pelo voto de confiança, abrindo as portas para minha entrada no mestrado. Agradeço ainda pelo incentivo ao crescimento pessoal e à construção de uma auto-confiança científica e didática, ao transmitir seu conhecimento e experiência acadêmica. Obrigado !

... à minha co-orientadora professora Valéria do Monti Nascimento Cunha pelos constantes incentivos, amizade, broncas, conhecimento e conselhos (principalmente na elaboração de aulas) que expandiram meus horizontes.

... à prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marília Zaluar Passos Guimarães pela revisão cuidadosa e comentários desta tese.

... aos membros da banca examinadora (Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Mermelstein, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Josiane Sabadini Neves, Prof. Dr. Paulo de Assis Melo, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marília Zaluar Passos Guimarães) que, com solicitude e disposição, aceitaram meu convite.

... aos amigos do Laboratório de Farmacologia Bioquímica de Órgãos e Sistemas (Camila, Sabrina, Alessandro, Fernanda, Humberto, Luiza, professora Valéria e professora Lucienne) pelos momentos de companheirismo, aprendizado e amizade que tornaram a rotina tão agradável.

... aos amigos do Laboratório de Farmacologia de Toxinas e Substâncias Antagonistas (Jair, Matheus, Marcos, Marcelo Amorim, Marcelo Strauch, Hilmar, Bruno, Jonathan, Vinicius), obrigado pela amizade e pelos momentos de descontração no dia-a-dia. Agradeço eternamente ao Professor e MESTRE Paulo de Assis Melo, a quem admiro principalmente pela amizade, apoio, lições e inspiração.

... aos meus pais Claudio (*in memoriam*) e Anamaria por todos os ensinamentos, suporte, educação e amor, que lapidaram a minha formação e me instigam a superação de novos desafios. Ao meu irmão André pelo apoio.

... à minha namorada e companheira July, pelo amor incondicional, e incentivo nos momentos difíceis.

## RESUMO

### Efeito da miotoxinas do veneno de *Bothrops jararacussu*, Bothropstoxina I e II, sobre ATPases de transporte iônico do músculo *extensor digitorum longus* de camundongos

Rodrigo Ayres de Oliveira

Orientadores: Luis Eduardo M. Quintas e Valéria do Monti Nascimento Cunha

*Resumo* da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia).

Acidentes com serpentes constituem um risco significativo para a saúde pública na América Latina e a mionecrose é uma das principais consequências incapacitantes. Experimentalmente, a injeção de veneno de *Bothrops jararacussu* causa necrose rápida e uma regeneração posterior do músculo *extensor digitorum longus* (EDL) de camundongos, com dano ao sarcolema e rápido efluxo de enzimas citosólicas e influxo de íons. Mostramos previamente que ATPases de transporte iônico essenciais para a homeostasia do cálcio intracelular são significativamente afetadas pelo veneno bruto, com um aumento global da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase e diminuição da Ca<sup>2+</sup>-ATPase reticular SERCA (Schaffazick *et al.*, *Toxicon* 55:52, 2010). Este trabalho visa estudar o efeito das miotoxinas bothropstoxina I e II (BthTX I e II) sobre a expressão das isoformas de SERCA e de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, durante o processo de necrose/regeneração do EDL e avaliar seus efeitos sobre a atividade destas ATPases *in vivo* e *in vitro*. Camundongos suíços adultos divididos em 4 grupos receberam uma injeção de 50 µl das miotoxinas (1 µg/g), isoladas ou associadas, ou uma solução salina (PSS) na pata direita. Os músculos EDL foram removidos 1, 3, 7 e 21 dias após a administração das miotoxinas e foram homogeneizados. O Western blot foi efetuado utilizando anticorpos específicos contra as isoformas α1 e α2 da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, e isoformas SERCA1 e 2. Além disso, experimentos foram realizados para determinar as atividades Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPásica e Ca<sup>2+</sup>-ATPásica por método colorimétrico. Observou-se uma redução da expressão da isoforma α2 da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase no 1º (BthTX II) e 3º dia (BthTX II e BthTX I+II) de necrose (n=3-6, p<0,05). Nenhuma mudança foi observada na expressão de α1, SERCA1 e SERCA2. A atividade Ca<sup>2+</sup>-ATPásica *in vivo* foi apenas inibida significativamente por BthTX I+II 1 dia, mas não 3 dias, após sua administração (n=5, p<0,05), podendo ter sido afetada por BthTX I e II, sendo necessários mais experimentos para confirmação. As miotoxinas não tiveram efeito sobre a atividade Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPásica *in vitro*. Todavia, BthTX II inibiu a atividade de Ca<sup>2+</sup>-ATPásica *in vitro* em concentrações muito baixas, com um CI<sub>50</sub> aparente em torno de 0,1 µg/ml (6 nM) enquanto BthTX I não afeta a atividade. Não parece haver potencialização das miotoxinas associadas. Em conclusão, as miotoxinas parecem atuar de modo diferente do veneno bruto sobre as ATPases, provavelmente induzindo um menor efeito degenerativo e inflamatório, corroborando com a hipótese de que outros componentes do veneno são importantes para a miotoxicidade *in vivo*. Por outro lado, BthTX II é um potente inibidor de SERCA, sendo um dos prováveis alvos principais desta miotoxina.

*Palavras-chave:* Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, Ca<sup>2+</sup>-ATPase, miotoxinas, *Bothrops jararacussu*, degeneração muscular.

Rio de Janeiro  
Abril/2013

## ABSTRACT

### Effect of myotoxins from *Bothrops jararacussu* venom, Bothropstoxin I and II, on ion transport ATPases of the murine *extensor digitorum longus* muscle

Rodrigo Ayres de Oliveira

Orientadores: Luis Eduardo M. Quintas e Valéria do Monti Nascimento Cunha

*Abstract* da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia).

Snakebites constitute a significant risk to public health in Latin America and myonecrosis is one of the main disabling consequences. Experimentally, the injection of *Bothrops jararacussu* venom causes rapid necrosis and a subsequent regeneration of the *extensor digitorum longus* (EDL) of mice, with sarcolemmal damage and rapid efflux of cytosolic enzymes and influx of ions. We have previously shown that ion transport ATPases essential to intracellular calcium homeostasis are significantly affected by the crude venom, with an overall increase of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and decrease of reticular Ca<sup>2+</sup>-ATPase SERCA (Schaffazick *et al.*, *Toxicon* 55:52, 2010). The present work aims to study the effect of myotoxins bothropstoxin I and II (BthTX I and BthTX II) on the expression of SERCA and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase isoforms during the mouse EDL necrosis/regeneration phenomenon and to assess their effect on these ATPases *in vivo* and *in vitro*. Adult Swiss mice divided into 4 groups received an injection of 50 µl of isolated or associated myotoxins (1 µg/g), or saline solution (PSS) on the right paw. The EDL muscles were removed 1, 3, 7 and 21 days after administration of myotoxins and homogenized. Western blot analysis was carried out using specific antibodies against Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase α1 and α2 isoforms and Ca<sup>2+</sup>-ATPase SERCA1 and 2 isoforms. Also, experiments were performed to determine Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and Ca<sup>2+</sup>-ATPase enzymatic activities by colorimetric method. We observed a reduced expression of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase α2 isoform at the 1<sup>st</sup> (BthTX II) and 3<sup>rd</sup> day (BthTX II and BthTX I+II) of necrosis (n=3-6, p<0.05). No changes were seen in Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase α1 and SERCA1 and 2 expression. Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity *in vivo* was only significantly inhibited by BthTX I+II 1 day, but not 3 days, after administration (n=5; p<0,05), and could be affected by BthTX I and II, but more experiments are needed. Myotoxins had no effect on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity *in vitro*. Nevertheless, BthTX II inhibited the Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity *in vitro* at very low concentrations, with an apparent IC<sub>50</sub> around de 0,1 µg/ml (6 nM) whereas BthTX I had no effect. No potentiation seems to be induced by myotoxin association. In conclusion, myotoxins seem to act differently from the crude venom on ion transport ATPases, probably inducing a lower degenerative and inflammatory effect, corroborating with the hypothesis that other venom components are important for the myotoxicity *in vivo*. On the other hand, BthTX II is a potent SERCA inhibitor, being one of the putative main targets of this myotoxin.

**Keywords:** Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, Ca<sup>2+</sup>-ATPase, myotoxins, *Bothrops jararacussu*, muscle degeneration.

Rio de Janeiro  
Abril/2013

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP- adenosina trifosfato  
PLA2 - fosfolipase A2 (PLA2)  
BthTXI - Bothropstoxina I  
BthTXII - Bothropstoxina II  
Lys49 – Lisina 49  
Asp49 – Aspartato 49  
SVMPs – metaloproteinases  
MEC - matrix extracelular  
DHPR - receptor de dihidropiridina  
DTT - ditioneitol  
EDL - músculo *extensor digitorum longus*  
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético  
[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> – concentração de cálcio intracelular  
IP<sub>3</sub>R - inositol-1,4,5-trifosfato  
NFAT - fator nuclear de células T ativadas  
IL-4 - gene interleucina-4  
NCX - trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>  
NKA - Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase  
PMCA - Ca<sup>2+</sup>-ATPases de membrana plasmática  
PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonila  
PKA - proteína cinase dependente de AMPc  
PSS - solução salina fisiológica  
ROCs - Canais de Ca<sup>2+</sup> acoplados a receptores  
RS- Retículo Sarcoendoplasmático  
RyR – receptor de Rianodina  
SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS  
SERCA - Ca<sup>2+</sup>-ATPase de retículo sarco-endoplasmático  
SOCs - canais de Ca<sup>2+</sup> regulados pelo estoque intracelular  
SPCA - Ca<sup>2+</sup>-ATPases localizadas no Complexo de Golgi  
TTBS - tampão Tris-salina contendo 0,1% de Tween 20  
WB- Western Blotting  
VOCs - canais de Ca<sup>2+</sup> sensíveis à voltagem

## LISTA DE FIGURAS

Tabela 1. Casos de acidentes por serpentes. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2010. Retirado de:  
[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tabela\\_inc\\_casos\\_serpente\\_01\\_04\\_2011.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tabela_inc_casos_serpente_01_04_2011.pdf).

Figura 1. Distribuição dos acidentes ofídicos no Brasil, de 1990-1993. (Retirado de: **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) - outubro/2001)

Figura 2. A) serpente *Bothrops jararacussu*; B) distribuição geográfica de *Bothrops jararacussu* no Brasil (retirado de Milani *et al*, 1997).

Figura 3. Sequência hipotética de eventos degenerativos em células musculares esqueléticas (Retirado de Gutiérrez & Ownby., 2003)

Figura 4. Ações diversas de metaloproteinases sobre células endoteliais (retirado de Gutiérrez *et al.*, 2005)

Figura 5. Eventos associados ao processo de degeneração/regeneração induzidos por venenos (Gutiérrez *et al*, 2007)

Figura 6. Papel da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase SERCA e  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase no controle da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  muscular. (Quintas, L.E.M.)

Figura 7. Esquema Post-Albers para o ciclo catalítico geral de transporte iônico das ATPases do tipo P (retirado de Kühlbrandt, 2004)..

Figura 8. Esquema representativo da administração das miotoxinas

Figura 9. Corte transversal da pata de camundongo. (retirada de Calvo *et al*, 2001)

Figura 10. Esquema representativo da preparação de EDL de camundongos utilizada nos experimentos

Figura 11. Modelo esquemático de ensaio de eletroforese e Western Blotting

Figura 12. Análise densitométrica das raias de proteína na membrana de nitrocelulose após as etapas de eletrotransferência e incubação com corante Rouge de Ponceau.

Figura 13. Expressão da isoforma SERCA1, 1 dia após a indução de mionecrose pelas miotoxinas BthTX I (1  $\mu\text{g/g}$ ), BthTX II (1  $\mu\text{g/g}$ ) e BthTX I+II (1  $\mu\text{g/g}$  de cada)

Figura 14. Expressão da isoforma SERCA1, 3 dias após a indução de mionecrose pelas miotoxinas BthTX I (1  $\mu\text{g/g}$ ), BthTX II (1  $\mu\text{g/g}$ ) e BthTX I+II (1  $\mu\text{g/g}$  de cada).

Figura 15. Expressão da isoforma SERCA2, 1 dia após a indução de mionecrose pelas miotoxinas BthTX I (1  $\mu\text{g/g}$ ), BthTX II (1  $\mu\text{g/g}$ ) e BthTX I+II (1  $\mu\text{g/g}$  de cada)

Figura 16. Expressão da isoforma SERCA2, 3 dias após a indução de mionecrose pelas miotoxinas BthTX I (1 µg/g), BthTX II (1 µg/g) e BthTX I+II (1 µg/g de cada).

Figura 17. Atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica 1 dia após a indução de mionecrose pelas miotoxinas BthTX I (1 µg/g), BthTX II (1 µg/g) e BthTX I+II (1 µg/g de cada).

Figura 18. Atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica 3 dias após a indução de mionecrose pelas miotoxinas BthTX I (1 µg/g), BthTX II (1 µg/g) e BthTX I+II (1 µg/g de cada).

Figura 19. Efeito de concentrações crescentes de BthTX I sobre a atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica em preparações de EDL de rato *in vitro*.

Figura 20. Efeito de concentrações crescentes de BthTX II sobre a atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica em preparações de EDL de rato *in vitro*.

Figura 21. Efeito de concentrações crescentes de BthTX I+II sobre a atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica em preparações de EDL de rato *in vitro*.

Figura 22. Comparação dos efeitos de BthTX II isolada e BthTX I+II em diferentes concentrações e proporções sobre a atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica em preparações de EDL de rato *in vitro*.

Figura 23. Expressão da isoforma  $\alpha 2$  da Na/K-ATPase 1 dia após a indução de mionecrose pelas miotoxinas BthTX I (1 µg/g), BthTX II (1 µg/g) e BthTX I+II (1 µg/g de cada).

Figura 24. Expressão da isoforma  $\alpha 2$  da Na/K-ATPase 3 dias após a indução de mionecrose pelas miotoxinas BthTX I (1 µg/g), BthTX II (1 µg/g) e BthTX I+II (1 µg/g de cada).

Figura 25. Expressão da isoforma  $\alpha 1$  da Na/K-ATPase 1 dia após a indução de mionecrose pelas miotoxinas BthTX I (1 µg/g), BthTX II (1 µg/g) e BthTX I+II (1 µg/g de cada).

Figura 26. Expressão da isoforma  $\alpha 1$  da Na/K-ATPase 3 dias após a indução de mionecrose pelas miotoxinas BthTX I (1 µg/g), BthTX II (1 µg/g) e BthTX I+II (1 µg/g de cada).

Figura 27. Efeito de BthTX I, BthTX II e BthTX I+II (40 µg/ml) sobre a atividade Na/K-ATPásica em preparações de rim (A) e hemisférios cerebrais (B) de rato *in vitro*.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	VI
ABSTRACT .....	VII
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....	VIII
LISTA DE FIGURAS .....	IX
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Acidentes ofídicos: relevância médica .....	1
1.2. Composição e ações do veneno de serpentes do gênero <i>Bothrops sp</i> .....	3
1.2.1. Miotoxinas fosfolipásicas .....	4
1.2.2. Outros componentes do veneno .....	7
1.3. Músculo esquelético e acidentes ofídicos .....	9
1.3.1. Degeneração/regeneração do músculo esquelético .....	10
1.4. Homeostasia intracelular do íon cálcio.....	12
1.5. ATPases do tipo P envolvidas no processo.....	14
1.5.1. Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase e isoformas .....	15
1.5.2. Ca <sup>2+</sup> -ATPases .....	16
2. OBJETIVO .....	19
3. MATERIAIS E METODOLOGIA .....	20
3.1. Reagentes .....	20
3.2. Administração das miotoxinas .....	20
3.3. Preparação do Músculo Extensor Digitorum Longus (EDL) .....	22
3.4. Dosagem de proteína .....	23

<b>3.5. Ensaio de SDS-PAGE e Western Blot.....</b>	<b>24</b>
<b>3.6. Ensaio de Atividade Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPásica e Ca<sup>2+</sup>-ATPásica .....</b>	<b>24</b>
<b>3.6.1. Atividade Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPásica e Ca<sup>2+</sup>-ATPásica <i>in vivo</i> .....</b>	<b>25</b>
<b>3.6.2. Inibição da Atividade Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPásica e Ca<sup>2+</sup>-ATPásica <i>in vitro</i> .....</b>	<b>26</b>
<b>3.7. Tratamento Estatístico .....</b>	<b>26</b>
<b>4. RESULTADOS_.....</b>	<b>28</b>
<b>4.1. Ensaio de Western Blot para avaliação da expressão de proteínas .....</b>	<b>28</b>
<b>4.2. Expressão das isoformas SERCA1 e 2 da Ca<sup>2+</sup>-ATPase no músculo EDL 1 e 3 dias após injeção perimuscular das miotoxinas BthTXI e/ou BthTXII .....</b>	<b>28</b>
<b>4.3. Efeito das miotoxinas BthTXI e/ou BthTXII na atividade Ca<sup>2+</sup>-ATPásica <i>in vivo</i> .....</b>	<b>34</b>
<b>4.4. Efeito das miotoxinas BthTXI, BthTXII e BthTX I+II na atividade Ca<sup>2+</sup>-ATPásica <i>in vitro</i> .....</b>	<b>35</b>
<b>4.5. Expressão das isoformas <math>\alpha</math>1 e 2 da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase no músculo EDL 1 e 3 dias após injeção perimuscular das miotoxinas BthTXI, BthTXII e BthTX I+II .....</b>	<b>38</b>
<b>4.6. Efeito das miotoxinas BthTXI e/ou BthTXII na atividade Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPásica <i>in vitro</i> .....</b>	<b>39</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>50</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>51</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Acidentes ofídicos: relevância médica

Acidentes envolvendo picadas de serpentes são um grave problema mundialmente, inclusive no Brasil (Tabela 1), cujas principais notificações são atribuídas aos agentes etiológicos pertencentes às espécies viperídeas (mais especificamente crotalíneos), em que se encontram os gêneros: *Crotalus* (p.ex., cascavel – 7,7%); *Lachesis* (p.ex., surucucu – 1,4%); *Bothrops sp.* (p.ex., jararaca, jararacussu – 90,9%); há também o gênero *Micrurus* (p.ex., coral 0,4%), único representante da família Elapinae. As serpentes do gênero *Bothrops sp.* são as responsáveis pela maioria dos acidentes, segundo dados do Ministério da Saúde brasileiro (Figura 1), causando danos prolongados e às vezes permanentes. Elas podem ser encontradas em beiras de rios, pântanos, florestas tropicais e plantações nas regiões Sul e Sudeste, no sul da Bahia e Mato Grosso do Sul, Argentina, Paraguai e Bolívia (figura 2) (Jorge & Ribeiro, 1990; Milani *et al.*, 1997; Schaffazick, 2009).

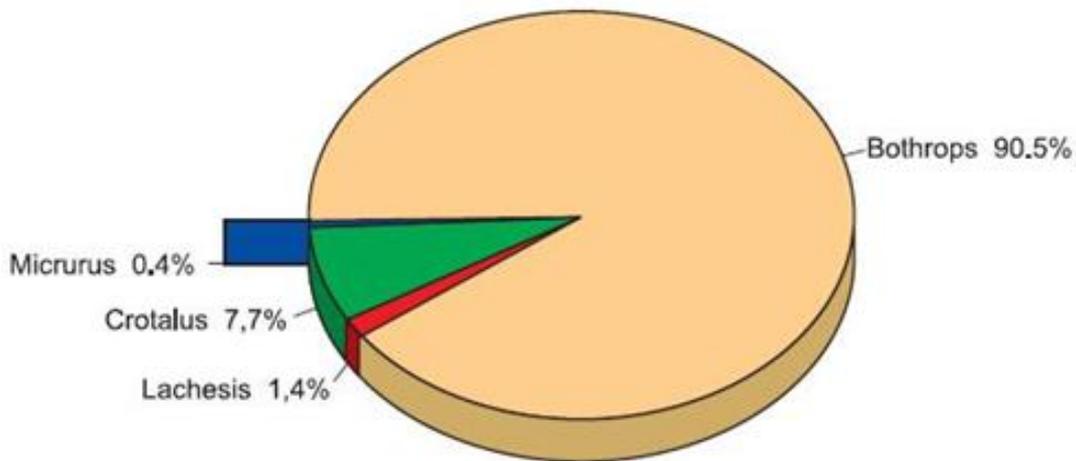
Como descrito em Santoro e colaboradores (2008), no Brasil são registrados anualmente cerca de 27.000 empeçonhamentos por serpentes (15 casos por 100.000 habitantes), ocasionando 100 óbitos a cada ano, sendo que 90% desses acidentes é causado por serpentes viperídeas; no entanto, o registro do número de casos de sequela permanente é desconhecido. No Sudeste brasileiro, as serpentes do gênero *Bothrops* são as responsáveis pela maioria dos acidentes, causando 97,5% dos casos de empeçonhamento por serpentes no estado de São Paulo. De acordo com a tabela 1, a maioria dos acidentes ofídicos ocorre nas regiões Norte e Centro-Oeste, além disso, observa-se que o número de acidentes vem aumentando ao longo dos anos, talvez o aumento da incidência de queimadas e desmatamento venha aumentando o contato das serpentes com o homem.

**Tabela 1. Casos de acidentes por serpentes. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas (2000 a 2011)**

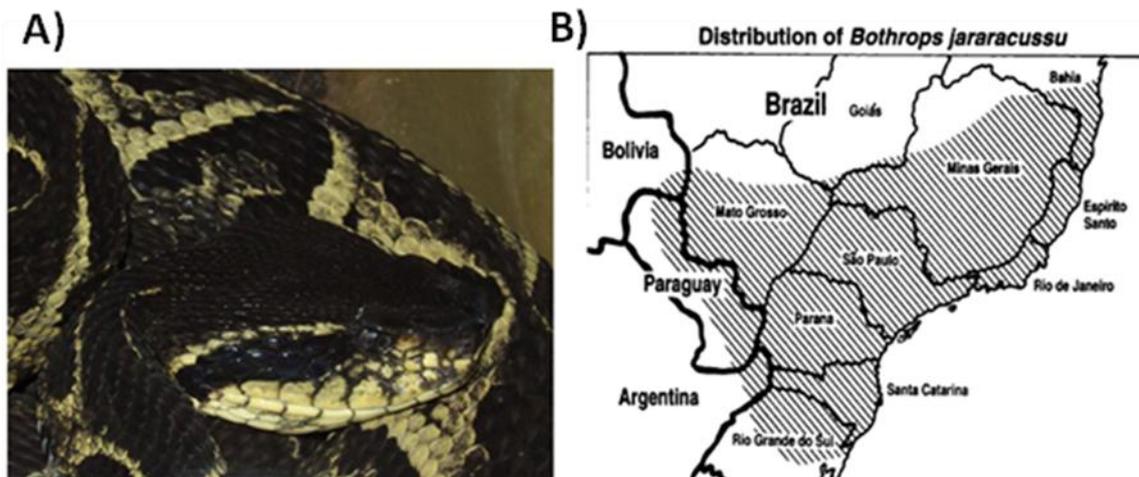
Região e UF	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010*	2011*	TOTAL**
<b>Região Norte</b>	<b>21,5</b>	<b>30,9</b>	<b>41,0</b>	<b>51,0</b>	<b>53,8</b>	<b>58,8</b>	<b>56,8</b>	<b>52,7</b>	<b>55,8</b>	<b>60,1</b>	<b>57,9</b>	<b>0,0</b>	<b>49,1</b>
Rondônia	21,6	29,7	37,4	51,9	45,5	45,2	38,4	31,3	29,3	28,7	30,1		35,4
Acre	18,7	17,4	29,5	34,1	39,2	48,2	48,6	42,6	60,0	61,8	74,6		43,2
Amazonas	11,1	9,4	20,8	31,1	44,6	54,0	51,9	39,6	46,8	50,2	41,7		36,5
Roraima	3,7	8,9	29,7	21,8	48,7	57,8	79,3	71,3	44,8	74,0	51,2		44,7
Pará	26,4	43,1	51,1	62,6	61,2	65,9	63,7	64,5	65,5	70,1	68,1		58,4
Amapá	3,1	1,8	15,1	34,0	43,8	41,5	43,0	38,8	43,2	44,8	36,5		31,4
Tocantins	34,4	44,3	60,9	61,1	59,4	62,3	57,5	53,2	62,5	66,8	77,9		58,2
<b>Região Nordeste</b>	<b>5,8</b>	<b>9,6</b>	<b>13,0</b>	<b>13,3</b>	<b>12,4</b>	<b>13,2</b>	<b>13,5</b>	<b>13,4</b>	<b>13,3</b>	<b>15,8</b>	<b>15,5</b>	<b>0,0</b>	<b>12,6</b>
Maranhão	5,5	12,1	18,0	19,3	17,8	22,3	22,4	24,2	23,7	22,4	25,1		19,3
Piauí	5,0	5,5	6,0	6,0	6,4	7,8	9,1	7,1	5,9	8,5	8,4		6,9
Ceará	0,8	3,4	8,5	9,1	10,4	9,9	7,5	7,4	8,2	10,1	9,9		7,7
Rio Grande do Norte	3,2	6,1	8,3	11,0	15,3	11,9	10,4	9,7	9,3	15,1	18,6		10,8
Paraíba	1,7	2,6	7,0	7,8	8,7	13,2	14,9	12,1	10,5	16,7	13,0		9,8
Pernambuco	2,7	4,5	7,3	9,4	7,3	8,1	9,0	9,3	8,8	9,5	8,4		7,7
Alagoas	5,0	7,8	10,1	10,0	7,8	8,7	8,4	10,5	11,4	12,4	11,6		9,4
Sergipe	0,4	1,4	1,5	1,3	3,0	2,7	3,2	8,3	11,0	11,8	8,8		4,9
Bahia	13,5	20,2	23,4	21,4	18,4	18,3	19,6	18,5	18,5	22,7	22,3		19,7
<b>Região Sudeste</b>	<b>4,9</b>	<b>8,1</b>	<b>9,1</b>	<b>10,0</b>	<b>10,8</b>	<b>9,6</b>	<b>9,7</b>	<b>8,4</b>	<b>8,8</b>	<b>7,9</b>	<b>7,9</b>	<b>0,0</b>	<b>8,7</b>
Minas Gerais	2,2	16,5	19,4	21,6	23,7	20,7	21,4	18,1	18,1	14,8	16,4		17,5
Espírito Santo	32,1	28,4	32,8	27,4	37,5	31,8	29,9	30,5	33,3	25,7	23,6		30,3
Rio de Janeiro	2,4	2,8	2,5	3,6	3,6	3,7	4,2	3,7	3,7	3,9	3,4		3,4
São Paulo	4,9	4,5	4,7	5,4	5,1	4,7	4,5	3,6	4,3	4,6	4,2		4,6
<b>Região Sul</b>	<b>4,9</b>	<b>8,5</b>	<b>10,3</b>	<b>10,9</b>	<b>10,5</b>	<b>9,9</b>	<b>10,6</b>	<b>11,2</b>	<b>10,3</b>	<b>10,7</b>	<b>9,9</b>	<b>0,0</b>	<b>9,8</b>
Paraná	1,4	8,4	9,2	8,7	8,3	9,2	9,1	10,5	9,7	9,6	8,9		8,5
Santa Catarina	14,3	13,0	13,6	15,8	14,7	14,1	14,3	14,6	13,9	14,7	12,7		14,2
Rio Grande do Sul	3,3	6,2	9,4	10,2	10,3	8,4	9,9	9,9	8,8	9,6	9,3		8,7
<b>Região Centro-Oeste</b>	<b>12,2</b>	<b>15,0</b>	<b>18,9</b>	<b>22,1</b>	<b>21,5</b>	<b>22,1</b>	<b>20,5</b>	<b>17,5</b>	<b>20,9</b>	<b>21,3</b>	<b>22,4</b>	<b>0,0</b>	<b>19,5</b>
Mato Grosso do Sul	12,0	12,3	13,8	18,2	22,9	21,3	19,8	14,4	25,3	23,2	18,5		18,3
Mato Grosso	2,6	18,9	29,6	35,7	39,6	42,3	41,1	39,7	39,9	43,3	46,1		34,4
Goiás	19,3	18,0	21,7	24,0	19,3	20,4	17,9	13,7	17,5	17,5	20,0		19,0
Distrito Federal	6,8	5,7	4,0	4,8	3,5	2,9	2,7	3,1	2,9	2,9	3,4		3,9
<b>Brasil</b>	<b>6,9</b>	<b>10,8</b>	<b>13,5</b>	<b>15,1</b>	<b>15,3</b>	<b>15,5</b>	<b>15,4</b>	<b>14,4</b>	<b>14,9</b>	<b>15,7</b>	<b>15,5</b>	<b>0,0</b>	<b>13,9</b>

Banco de dados atualizado em: 9/7/2008 9/7/2008 9/7/2008 9/7/2008 9/7/2008 9/7/2008 9/7/2008 9/7/2008 16/3/2011 17/3/2011 14/3/2011 14/3/2011

Retirado de: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tabela\\_inc\\_casos\\_serpente\\_01\\_04\\_2011.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tabela_inc_casos_serpente_01_04_2011.pdf)  
(Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde, 2001)



**Figura 1.** Distribuição dos acidentes ofídicos no Brasil, de 1990-1993, segundo o gênero da serpente peçonhenta. (Retirado de: **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) - outubro/2001)



**Figura 2.** A) serpente *Bothrops jararacussu*; B) distribuição geográfica de *Bothrops jararacussu* no Brasil (retirado de Milani *et al*, 1997)

## 1.2 Composição e ações do veneno de serpentes do gênero *Bothrops sp.*

Os venenos são misturas complexas de componentes orgânicos e inorgânicos. Os componentes orgânicos são compostos em sua maioria por material proteico, apresentando também nucleotídeos e aminoácidos, aminas biogênicas, lipídeos e carboidratos. Com

relação aos componentes inorgânicos, podem variar entre espécies e incluem íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{Co}^{2+}$ . Acredita-se que alguns elementos como o  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$  possam ter envolvimento com o mecanismo catalítico de enzimas presentes no veneno, como por exemplo, as metaloproteinases; enquanto,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  participam da estabilização de certas proteínas. (Bjarnason & Fox, 1994).

Dentre a grande variedade de componentes do veneno de serpentes, as toxinas que possuem atividade de fosfolipase  $\text{A}_2$  ( $\text{PLA}_2$ ) podem gerar diversos efeitos biológicos, como: miotoxicidade, neurotoxicidade, citotoxicidade, cardiotoxicidade e hemólise (Bonfim *et al.*, 2009). Em casos que afetam o tecido renal, o envenenamento pode levar clinicamente à falência renal aguda (caracterizada pela redução da filtração glomerular e da reabsorção tubular de  $\text{Na}^+$ ), dano renal (glomerulonefrite aguda ou necrose cortical) e diversas alterações funcionais como: acidose metabólica, hipercalemia, oligúria ou anúria e aumento das concentrações séricas de uréia e creatinina (Linardi *et al.*, 2011).

Acidentes com serpentes da espécie *B. jararaca* podem gerar manifestações locais (equimose, edema, bolhas e necrose) e sistêmicas, como incoagulabilidade sanguínea e sangramento espontâneo (epistaxis, sangramento gengival, hematúria) (Santoro *et al.*, 2008).

A espécie de serpente *B. jararacussu* possui um veneno com atividade citotóxica (relacionada a resíduos catiônicos e hidrofóbicos localizados na região C-terminal de enzimas tipo  $\text{PLA}_2$ ), que pode contribuir para os efeitos inflamatórios e necrose local, e está particularmente relacionado à atividade miotóxica direta, caracterizada por alterações estruturais do tecido muscular e mionecrose (Bonfim *et al.*, 2009; Schaffazick *et al.*, 2010). A atividade miotóxica pode ser avaliada através do aumento nos níveis de creatina cinase plasmática, que ocorre como consequência do dano ao sarcolema (Calil-Elias *et al.*, 2002; Da Silva *et al.*, 2007). Ademais, proteases hemorrágicas como a bothropasina e a jararhagina promovem o rompimento de vasos sanguíneos e um rápido processo de degradação de proteínas da matriz subendotelial, levando a hemorragia local ou mesmo sistêmica, e o quadro de isquemia muscular possivelmente contribui para o efeito miotóxico (Da Silva *et al.*, 2007).

### 1.2.1 Miotoxinas $\text{PLA}_2$

A superfamília das  $\text{PLA}_2$  foi classificada em 11 grupos e 23 subgrupos. Os venenos  $\text{PLA}_2$  podem ser da classe I (encontrados em elapídeos terrestres e serpentes marinhas),

classe II (serpentes viperídeas) e grupo III (abelhas e lagartos). As PLA<sub>2</sub> das classes I e II apresentam cerca de 14 kDa (Gutiérrez & Ownby, 2003; Ambrosio *et al.*, 2005).

PLA<sub>2</sub> miotóxicas podem ligar-se com afinidade variável a diferentes tipos de aceptores na membrana de músculos esqueléticos: domínios lipídicos enriquecidos em glicerofosfolipídeos podem constituir aceptores para essas fosfolipases, que podem ligar-se também a receptores de membrana com multidomínios, como receptores do tipo-M (com 8 domínios homólogos para regiões de reconhecimento de carboidratos de lectina do tipo-C) e receptores do tipo-N, embora não tenha sido publicado na literatura qualquer evidência que comprove uma ação miotóxica decorrente do acoplamento a esses receptores (Gutiérrez & Ownby, 2003). Essas miotoxinas são encontradas em maiores concentrações no veneno de *B. jararacussu* e *B. asper* (Zychar *et al.*, 2010).

As miotoxinas policatiônicas estudadas e cruciais para esse processo são a bothropstoxina I (BthTX I) e a bothropstoxina II (BthTX II), que são PLA<sub>2</sub> básicas do grupo II e diferem entre si por substituintes em resíduos localizados na região de ligação de cálcio (*calcium binding-loop*), pesando cerca de 15 kDa. A BthTX I possui o aminoácido Lisina na posição 49, o que afeta a capacidade dessa enzima se ligar ao Ca<sup>2+</sup>, que é necessário para estabilização do intermediário tetraédrico para reação catalítica, tornando-a conhecida também como enzima miotóxica Lys49, uma PLA<sub>2</sub> desprovida de atividade catalítica. A BthTX II possui um aspartato na posição 49, podendo ser chamada, dessa forma, enzima ativa Asp49, uma PLA<sub>2</sub> que possui atividade catalítica. Além disso, cabe destacar que não pode ser excluída a hipótese das toxinas entrarem na célula após o dano no sarcolema, contribuindo posteriormente para o agravamento da patologia (Homsí-Brandeburgo *et al.*, 1988; Gutiérrez & Ownby, 2003; Teixeira *et al.*, 2003; Mora *et al.*, 2006; Da Silva *et al.*, 2007; Bonfim *et al.*, 2009; Cintra-Francischinelli *et al.*, 2009; Schaffazick *et al.*, 2010).

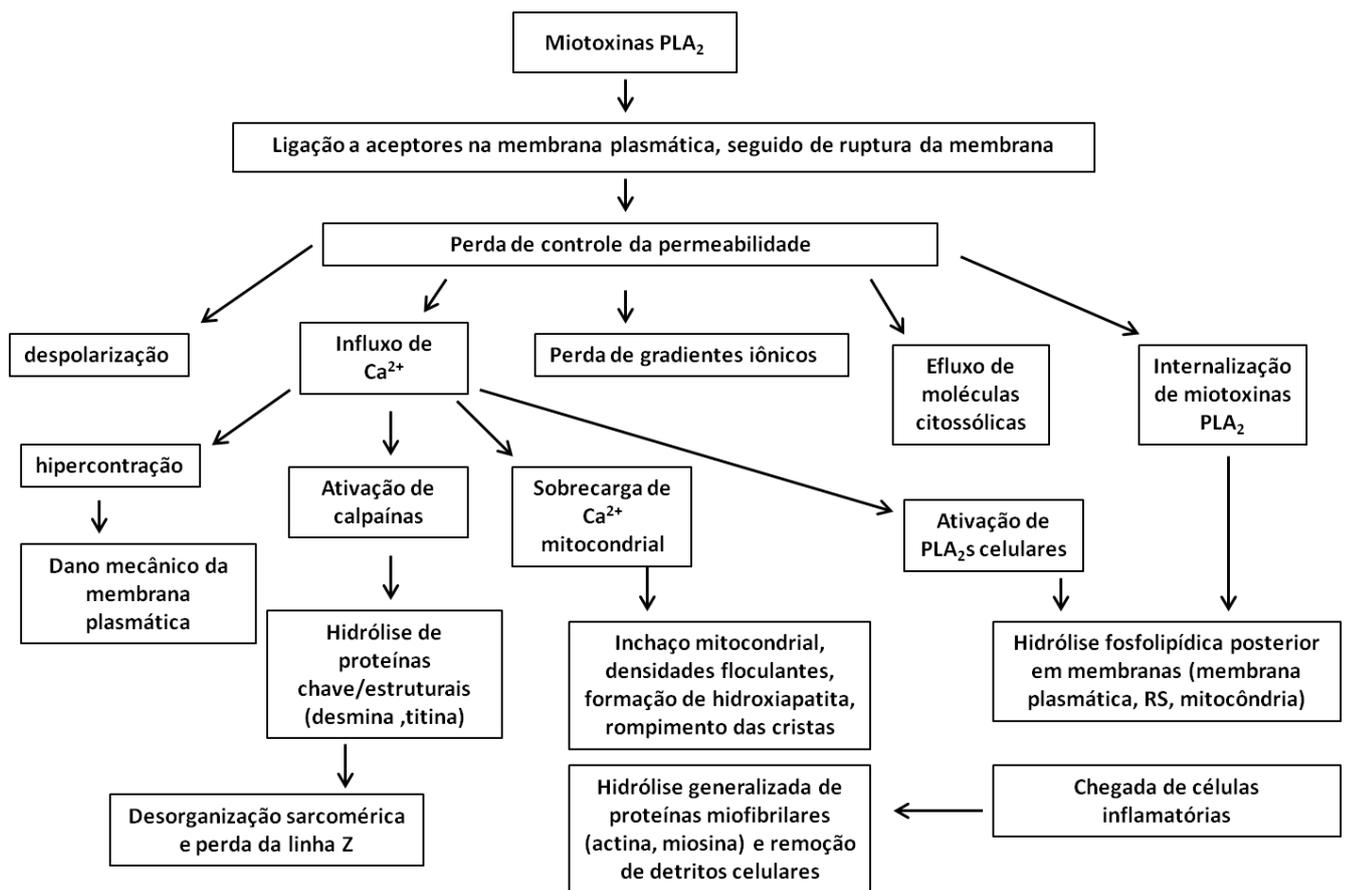
As enzimas acima descritas diferem também no que tange ao seu mecanismo de ação. A BthTX I gera desarranjo da organização macromolecular da bicamada lipídica através de um mecanismo de interação eletrostática, tendo em vista que os resíduos catiônicos dessa PLA<sub>2</sub> interagem com a bicamada carregada de cargas negativas. A BthTX II também promove ruptura da membrana plasmática, no entanto, por ter ação catalítica, ela catalisa a hidrólise da ligação éster 2-acil de 3-m-fosfoglicerídeos de membrana, processo esse que requer Ca<sup>2+</sup>, produzindo 3-sn-lisofosfoglicerídeos e ácidos graxos, que podem lesar a membrana devido a sua ação detergente (Gutiérrez & Ownby, 2003; Ambrosio *et al.*, 2005; Bonfim *et al.*, 2009) (figura 3).

Nesse panorama, diversos autores relatam que o sítio de ação das miotoxinas é a membrana plasmática, que por sua vez tem sua integridade rompida e que consensualmente acredita-se resultar no influxo de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e seu acúmulo no citoplasma, levando a uma série de eventos que culminam em morte celular do músculo afetado. Estudos recentes, entretanto, mostram que pode haver contribuição importante da mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular para a ação das miotoxinas, mobilização esta que poderia ocorrer mesmo antes do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente do meio extracelular. Este mecanismo também sugere a possível ativação de vias de sinalização intracelulares (Da Silva *et al.*, 2007; Bonfim *et al.*, 2009; Cintra-Francischinelli *et al.*, 2009; Schaffazick *et al.*, 2010). Além do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , a ruptura da membrana plasmática muscular pode acarretar no rápido efluxo de creatina cinase, lactato desidrogenase, aspartato aminotransferase, mioglobina e creatina (Gutiérrez & Ownby, 2003).

Outro aspecto importante é a associação das fosfolipases miotóxicas Asp49 e Lys49 com eventos inflamatórios e de hiperalgesia, que decorrem da ação de prostaglandinas e também da bradicinina em receptores B2. Na Lys49 a região que confere hiperalgesia é a mesma região responsável pelas ações bactericida, citolítica, edematogênica e miotóxica. As fosfolipases endógenas podem ser originadas a partir de tecidos inflamados (em decorrência da ação dessas miotoxinas), podendo participar da degradação do ácido araquidônico (principal precursor de eicosanóides), e conseqüentemente liberação do araquidonato, cuja conversão pela ação de ciclooxigenases resulta na biossíntese de prostaglandinas, tromboxano e prostaciclina. Além disso, essas miotoxinas agem em mastócitos, promovendo liberação de histamina e serotonina, que também podem contribuir para os efeitos inflamatórios. A ação catalítica (presente na Asp49) determina a intensidade do efeito nociceptor, no entanto, não é essencial para que ocorra formação de edema, desgranulação de mastócitos, hiperalgesia e inflamação (já que a Lys 49 também pode promover essas ações), sendo mais importantes outras características como ativação de fosfolipases citossólicas endógenas, fosfolipases secretoras, e o conteúdo catiônico (Teixeira *et al.*, 2003; Zamuner *et al.*, 2005; Zychar *et al.*, 2010).

Portanto, miotoxinas são componentes do veneno que podem afetar células da musculatura esquelética, causando citotoxicidade e induzindo diversas alterações patológicas (figura 3), como por exemplo: hipercontração de miofilamentos e inchaço mitocondrial; formação de lesões-delta (áreas características de degeneração que se localizam na periferia

de fibras musculares); ruptura de membranas plasmáticas, mitocondriais e também de membranas intracelulares (retículo sarcoplasmático); picnose de núcleos. Sob essa ótica, as miotoxinas fosfolipásicas A<sub>2</sub> são polipeptídeos de cadeia única que hidrolisam fosfolipídeos da membrana, levando à despolarização da fibra muscular e degradação celular (Gutiérrez & Ownby, 2003; Harris, 2003; Villalobos *et al.*, 2007).



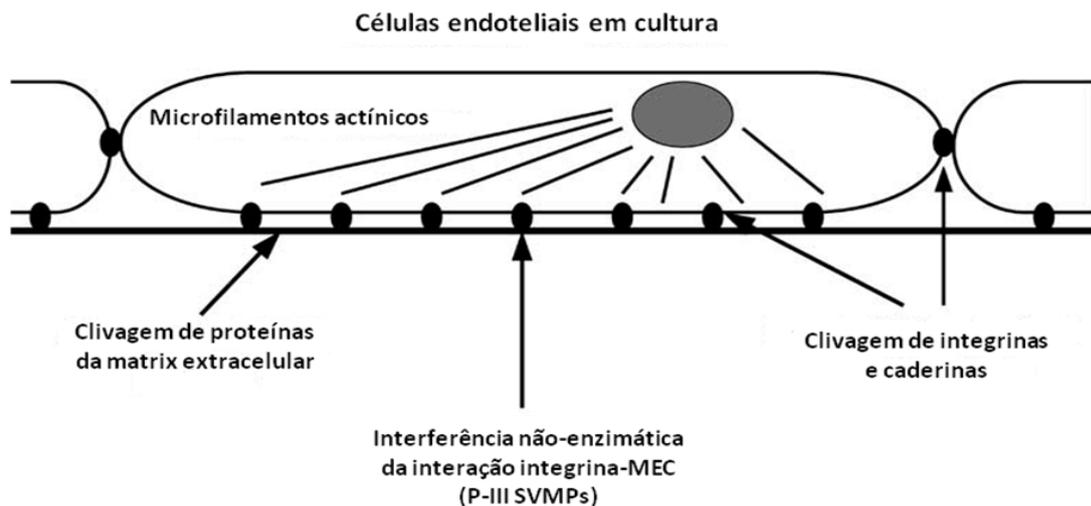
**Figura 3. Sequência hipotética de eventos degenerativos em células musculares esqueléticas** (Retirado de Gutiérrez & Ownby, 2003)

### 1.2.2 Outros componentes do veneno

Acredita-se que a ação proteolítica das metaloproteinases do veneno de serpentes (SVMs) seja responsável pela hemorragia local (hemorragia *per rhexis* e hemorragia por diapedese), e a inflamação local resulta da contração endotelial celular e da ampliação das

junções intercelulares de vênulas, facilitando o extravasamento. Em células endoteliais em cultura, como mostrado na figura 4, as SVMPs podem: hidrolisar os componentes da matriz extracelular (através de uma clivagem pró-sequência que leva à ativação enzimática), particularmente aqueles que formam a membrana basal, que circunda células endoteliais nos capilares e vênulas; clivar proteínas da MEC; clivar integrinas e caderinas, envolvidas na adesão célula-célula e célula-matrix; além disso, sequências presentes nos domínios desintegrina-*like* e de cisteína podem interagir com integrinas por um mecanismo não enzimático. Como consequência dessas ações, ocorre uma perda de interações célula-célula e célula-matrix, afetando miofilamentos de actina do citoesqueleto, causando desorganização de fibras, podendo acarretar em morte celular por apoptose (Gutiérrez *et al.*, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2007). Essas SVMPs também podem causar miotoxicidade, através de um mecanismo indireto relacionado à isquemia secundária ao rompimento da microvasculatura e interrupção do fluxo sanguíneo; levar à formação de bolhas e dermonecrose, devido à hidrólise de proteínas da junção dermo-epidérmica; provocar subsequente agregação plaquetária e ativação da cascata de coagulação, podendo complicar a disseminação da coagulação intravascular (Kawano *et al.*, 2002; Gutiérrez & Ownby, 2003; Gallager *et al.*, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2007).

A hialuronidase também é uma enzima presente no veneno que pode degradar a MEC, contribuindo para o espalhamento do veneno (Gutiérrez *et al.*, 2007).



**Figura 4.** Ações diversas de metaloproteínases sobre células endoteliais (retirado de Gutiérrez *et al.*, 2005).

O veneno de *B. jararaca* contém: ativadores de fator II e fator X, e enzimas do gênero trombina (serina proteases) que estão relacionados com a falência de órgãos e a coagulopatia de consumo; e fator ativador de plaquetas (botrocetina), que pode induzir trombocitopenia (Kawano *et al.*, 2002). As serina proteases atuam diretamente no fibrinogênio, participando dessa forma de distúrbios da coagulação, podem causar distúrbios na pressão sanguínea devido à produção sistêmica de bradicinina (prolonga o efeito hipotensor, ao inativar a dipeptidase peptídica que destrói a bradicinina e converte angiotensina I em II – descoberta que resultou na síntese do captopril), não contribuem significativamente para processos inflamatórios (Warrell, 2010; Zychar *et al.*, 2010).

Portanto, as SVMPs e as PLA<sub>2</sub> possuem envolvimento com a nocicepção e com o processo inflamatório (maior importância das SVMPs), diferentemente das serina proteases, que parecem não contribuir para esses efeitos patológicos (Zychar *et al.*, 2010).

### 1.3 Músculo esquelético e acidentes ofídicos

Um dos principais tecidos afetados pelo emponhamento é o músculo estriado esquelético. Este é caracterizado pela presença de fibras, células polinucleadas envoltas por membrana plasmática (sarcolema), que contém organelas celulares e miofibrilas, cujas proteínas constituintes organizadas longitudinalmente formam os sarcômeros, unidades contráteis da fibra. O músculo é envolvido por tecido conjuntivo, que possui as seguintes camadas: endomísio (presença de capilares); perimísio, que envolve os fascículos (grupos de fibras); epimísio (camada mais externa) (Mebs & Ownby, 1990).

O músculo *extensor digitorum longus* (EDL) é um músculo esquelético de contração rápida, que contém um grande número de fibras pobres em mitocôndrias, predominando fibras glicolíticas tipo IIB, sendo pouco resistentes à fadiga. Esse tipo de fibra muscular é caracterizado por rápida atividade ATPásica e captação de Ca<sup>2+</sup> do retículo sarcoplasmático, baixa capacidade oxidativa e alta capacidade glicolítica. (Fuchs, 1989; Melo & Ownby, 1996; Mendler *et al.*, 1998). Cabe destacar que, para efeito de comparação, fibras de contração lenta (fibras tipo I) apresentam maior resistência à fadiga devido à alta atividade de enzimas oxidativas e a seu maior volume mitocondrial, e diferenças na velocidade de contração existem principalmente devido a diferenças nas isoformas de miosina (Baylor & Hollingworth, 2012).

### 1.3.1 Degeneração e regeneração do músculo esquelético

A entrada dos componentes do veneno nos tecidos (mostrado na figura 6) leva a alterações patológicas que desencadeiam uma resposta inflamatória associada com a síntese e liberação de mediadores que podem levar à formação de edema e a dor, e ao recrutamento de células inflamatórias (como neutrófilos, primeiros a chegar, seguidos posteriormente por macrófagos), podendo desencadear regeneração e reparação tecidual ou posterior dano tecidual. Dependendo da concentração das toxinas, as PLA<sub>2</sub> e as SVMs podem estimular fibroblastos e macrófagos a expressarem um conjunto complexo de respostas celulares associadas com o aumento de genes envolvidos na inflamação e apoptose em fibroblastos (Gutiérrez *et al.*, 2007). As células afetadas podem entrar em apoptose através de diferentes mecanismos como, por exemplo, a ativação da via das caspases mediadas por calpaínas, e a formação de um poro de transição permeável na membrana da mitocôndria, em decorrência do aumento da [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (Gutiérrez & Ownby, 2003).

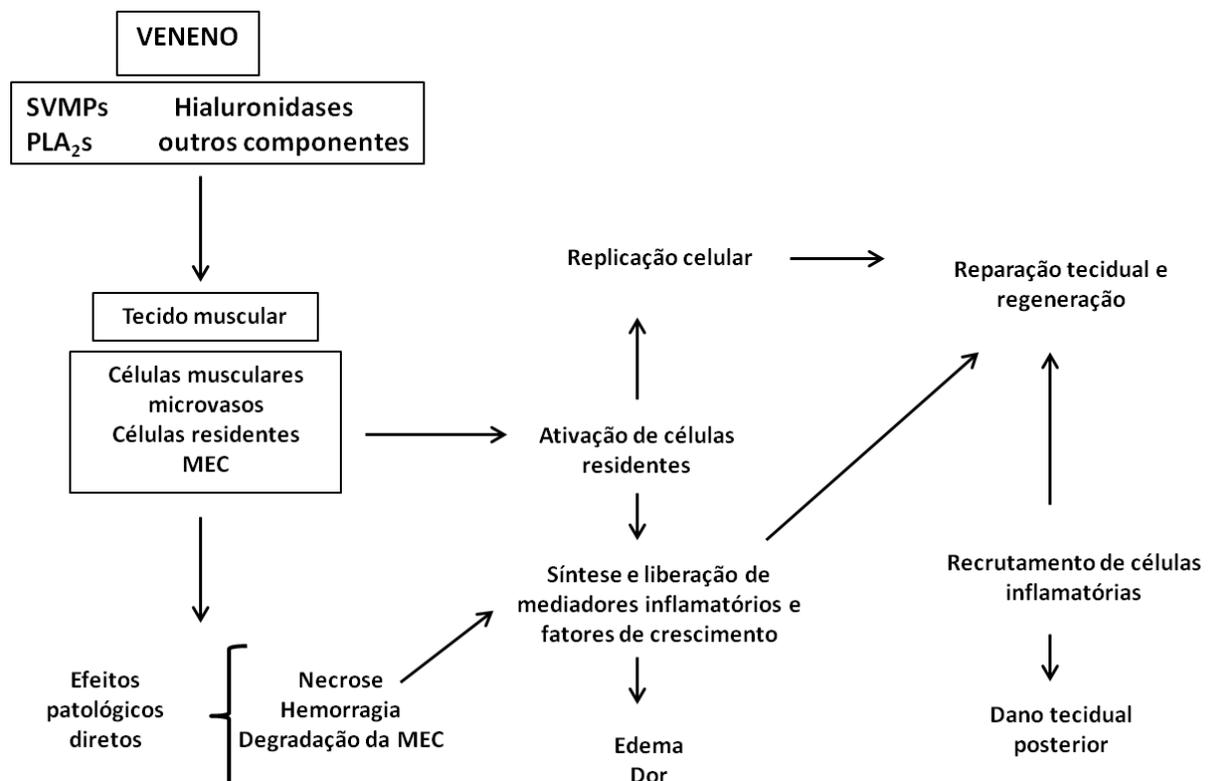
Outro efeito gerado pelo aumento da [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> sarcoplasmático na fibra muscular é o estímulo da via da calcineurina (uma fosfatase Ca<sup>2+</sup>-calmodulina dependente de serina-treonina), que por sua vez desfosforila o fator nuclear de células T ativadas (NFAT), que entra no núcleo e estimula a transcrição do gene interleucina-4 (IL-4); desse modo, a IL-4 liga-se a receptores nos mioblastos, gerando o amadurecimento em miotubos e fibras jovens. (Zádor *et al.*, 2011)

O veneno viperídeo produz um aumento de fatores pró-inflamatórios: óxido nítrico, fator necrótico tumoral- $\alpha$ , interferon gama, interleucina 1 $\beta$ , interleucina-6. Esses fatores favorecem o influxo do infiltrado inflamatório polimorfonuclear de leucócitos, com a chegada de neutrófilos e posteriormente de macrófagos no local de ação do veneno, resultando na destruição do tecido local. Segundo alguns pesquisadores, existe a possibilidade de que a migração de leucócitos ocorra através de uma via mediada por PLA<sub>2</sub>, no que tange ao veneno de *B. lanceolatus*. (Gallager *et al.*, 2005)

A regeneração do músculo esquelético ocorre através da ativação e diferenciação de células satélites miogênicas (localizadas entre a membrana plasmática e a lâmina basal), e tem início cerca de 6-12 h após o dano, além de ser dependente de ações de muitas células e fatores de crescimento. As PLA<sub>2</sub> têm ação quimiotática, favorecendo tanto invasão de macrófagos quanto ativação das células satélites, que podem migrar de áreas não afetadas das fibras musculares para regiões com dano. Desse modo, a fusão de células acarreta na

formação de fibras multinucleadas, e por volta de 7 dias ocorre a reconstrução do sarcômero, tendo em vista a organização total das proteínas contráteis actina e miosina. Nesse contexto, insere-se também a necessidade de uma eficiência na circulação local para uma regeneração total do músculo, que sofre um atraso em decorrência da ruptura da microvasculatura local pela ação de metaloproteinases hemorrágicas (Harris, 2003; Gutiérrez *et al.*, 2007).

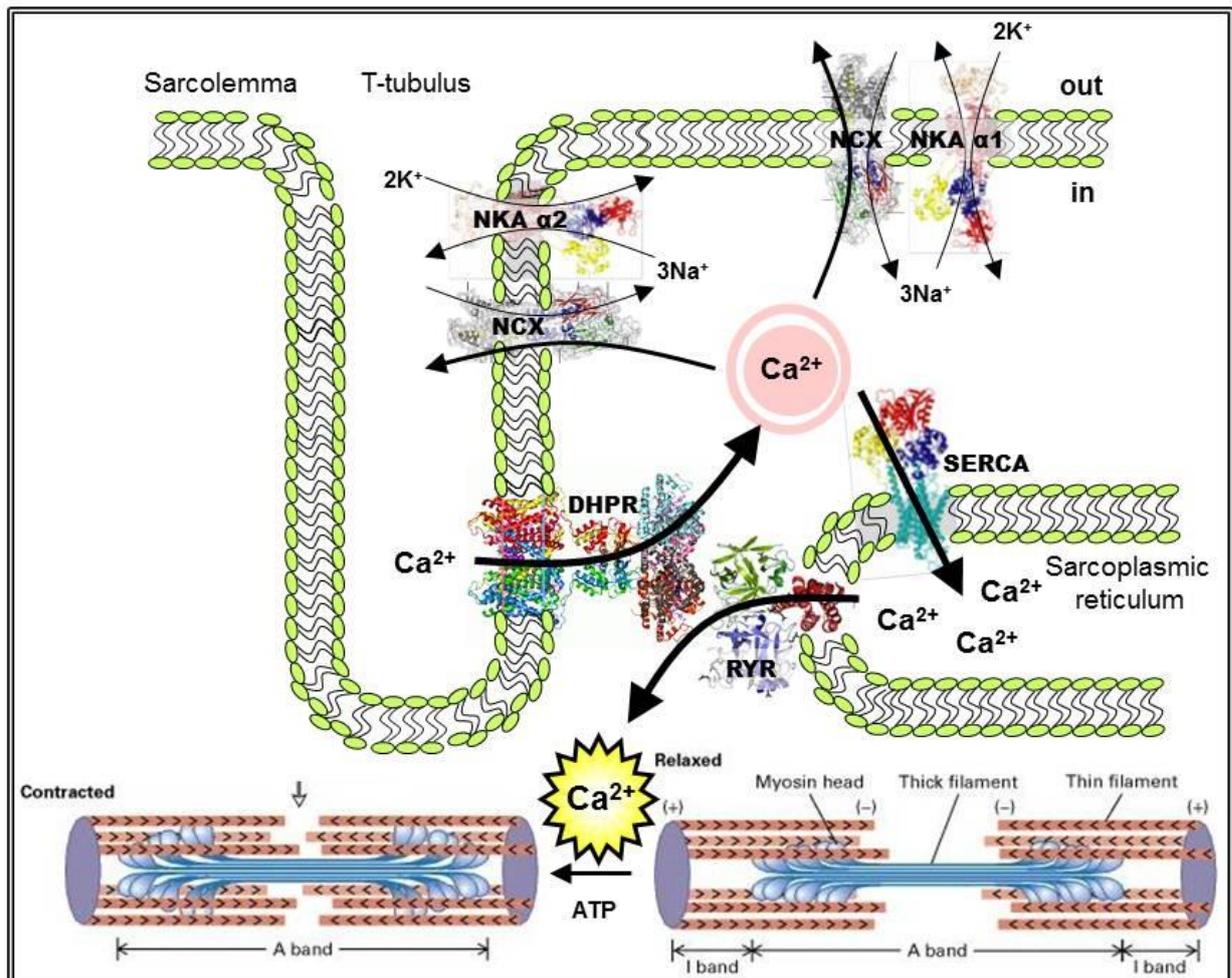
Um aspecto importante presente durante o processo de lesão muscular é a formação de radicais livres. Os radicais livres, especialmente as espécies reativas de oxigênio, provocam estresse oxidativo e afetam as funções celulares (e.g., causando sobrecarga na  $[Ca^{2+}]_i$ ; Kaneko *et al.*, 1994), alterando o estado redox de proteínas com consequente inibição da atividade de diversas enzimas. De fato, sabe-se que tióis (-SH) no estado reduzido são fundamentais para a atividade catalítica de ATPases (Schoot *et al.*, 1978). Apesar da geração de radicais livres ter sido caracterizada em diversos tipos de lesão muscular esquelética, isso ainda foi muito pouco explorado no modelo de degeneração por miotoxinas ofídicas (Vignaud *et al.*, 2005), não havendo estudos sobre o seu efeito em enzimas.



**Figura 5. Eventos associados ao processo de degeneração/regeneração induzidos por venenos** (Gutiérrez *et al.*, 2007)

### 1.4 Homeostasia intracelular do íon cálcio

Como exposto, o controle intracelular do íon  $\text{Ca}^{2+}$ , essencial para o funcionamento do músculo esquelético, é afetado durante a degeneração e regeneração muscular induzidas pelo veneno e seus componentes mitotóxicos. Os sistemas responsáveis por essa modulação serão detalhados a seguir.



**Figura 6. Papel da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase SERCA e  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase no controle da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  muscular.** Esquema que representa proteínas que controlam a homeostasia do cálcio. Após o potencial de ação muscular há a abertura de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L (sensíveis à diidropiridina, DHPR) resultando em rápido influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  que promove a abertura dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  sarcoplasmáticos sensíveis à rianodina (RYR). A grande mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo permite o deslizamento dos miofilamentos de miosina e actina, ou seja, contração muscular. A  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de retículo sarco/endoplasmático (SERCA) é a principal via de redução da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) e enriquecimento do estoque reticular, com conseqüente relaxamento muscular. A  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase (NKA), isoformas  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ , são a força motriz para a atividade do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX), que também contribui para a redução da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  pela extrusão de  $\text{Ca}^{2+}$ . (Quintas, L.E.M.)

O íon  $\text{Ca}^{2+}$  desempenha um papel fundamental como mensageiro em células eucarióticas, participando de diversos eventos ligados à sobrevivência ou à morte celular. O estímulo celular gerado por diferentes agentes pode promover o aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  livre no citoplasma, o que provoca uma resposta celular que é dependente da via/origem do fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula, da amplitude e da frequência do aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  e também do sítio de ação (Rasmussen & Barret, 1984; Mauger *et al.*, 1985; Putney, 1998). O equilíbrio dinâmico entre os sistemas de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  proporciona a homeostasia intracelular desse íon, sendo grande parte promovida pela  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de retículo sarco-endoplasmático (SERCA) e  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (Figura 6).

A entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula pode ocorrer através da ação de: 1) Canais de  $\text{Ca}^{2+}$  acoplados a receptores (ROCs), ativados por neurotransmissores como glutamato e ATP (agonistas); 2) canais de  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis à voltagem (VOCs), que podem ser encontrados em células excitáveis; 3) canais de  $\text{Ca}^{2+}$  regulados pelo estoque intracelular (SOCs), cuja abertura ocorre em decorrência do esvaziamento do estoque (Mori *et al.*, 1993; Berridge *et al.*, 1999; Berridge *et al.*, 2000).

Ele pode ser liberado dos reservatórios intracelulares através de canais sensíveis à rianodina (RyR) e ao inositol-1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3\text{R}$ ), que também são sensíveis a esse íon, podendo ocorrer o processo chamado “ $\text{Ca}^{2+}$  libera  $\text{Ca}^{2+}$ ”, como consequência de um pequeno aumento em sua concentração. Cabe destacar que em maiores concentrações ocorre inibição da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  (Bootman & Berridge, 1995). Após a liberação desse íon do retículo sarcoplasmático, ele se liga à troponina C, mudando a conformação do complexo troponina-tropomiosina, com isso, os locais ativos dos filamentos de actina não estão mais inibidos, de modo que a miosina possa interagir com a actina, ocorrendo a contração. Quando a concentração do  $\text{Ca}^{2+}$  diminui, ele se dissocia da troponina e, assim, a contração também diminui. (Martonosi & Pikula, 2003; Baylor & Hollingworth, 2012)

A mitocôndria pode acumular  $\text{Ca}^{2+}$  através do uniporter de  $\text{Ca}^{2+}$ , um canal que é aberto quando as concentrações citoplasmáticas de  $\text{Ca}^{2+}$  estão elevadas, sendo modulado pelo fosfato inorgânico, ATP e  $\text{Mg}^{2+}$ . Porém, no processo de regulação do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, essa organela possui um papel secundário. A ativação da síntese mitocondrial de ATP ocorre juntamente com a contração muscular produzida pelo  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e com outros eventos celulares dependentes de ATP (Martonosi & Pikula, 2003).

A mediação da resposta celular conta com a participação de certas proteínas que são importantes para sinalização celular como, por exemplo, as proteínas ligadoras de  $\text{Ca}^{2+}$ , que

podem agir como reguladoras da expressão genética (como as proteínas ligadoras do núcleo), participar da demanda fisiológica celular devido a seu envolvimento na produção de energia (enzimas sensíveis ao  $\text{Ca}^{2+}$ , como as desidrogenases mitocondriais e fosforilases cinases), ou reguladores da atividade de enzimas como a SERCA (por exemplo, calmodulina; Rodriguez *et al.*, no prelo) e a actomiosina (regulada pela troponina) e proteínas cinases  $\text{Ca}^{2+}$ -dependentes. Dentro do retículo sarcoplasmático, a calsequestrina age como um tampão de  $\text{Ca}^{2+}$  na cisterna terminal, a calreticulina e calnexina atuam como chaperonas no enovelamento proteico (Berridge *et al.*, 2000; Chin & Means, 2000; Martonosi & Pikula, 2003).

O transporte ativo constante do  $\text{Ca}^{2+}$  e a baixa permeabilidade da membrana a esse íon são importantes para a manutenção da homeostasia de  $\text{Ca}^{2+}$ . O sinal intracelular, tido como um pico de  $\text{Ca}^{2+}$  ou chamado de transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (pode atingir até 1  $\mu\text{M}$ ), caracteriza um aumento na quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  livre citoplasmático. (Putney, 1998; Thomas *et al.*, 1996; Chin & Means, 2000).

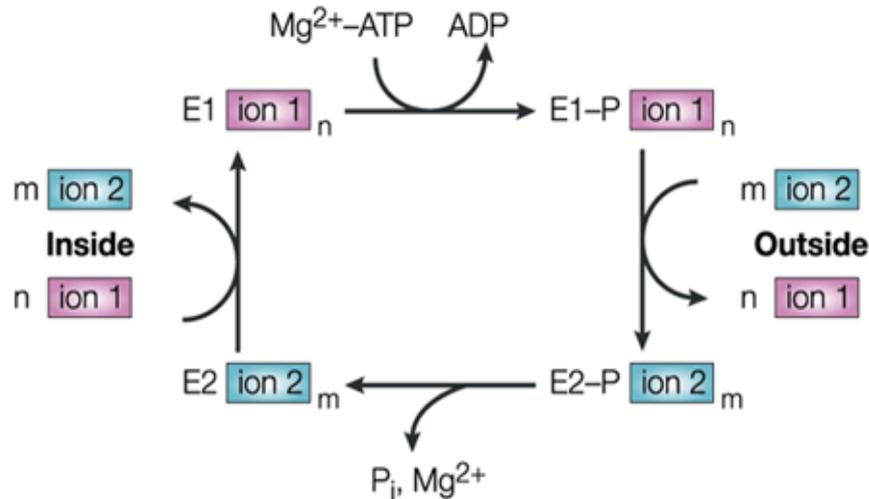
Existem diferentes tipos de sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$ , denominadas: “*Blip*” (relacionadas ao receptor de  $\text{IP}_3$ ) e “*Quark*” (relacionada ao receptor de Ryanodina) que são aberturas de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  decorrentes de pequenos estímulos; “*Puff*” (relacionadas ao  $\text{IP}_3\text{R}$ ) e “*Spark*” (relacionada ao RyR), originadas por estímulos mais intensos; “*Waves*”, são ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares, decorrentes do processo “ $\text{Ca}^{2+}$  libera  $\text{Ca}^{2+}$ ”, que podem atravessar junções em alguns tecidos. (Bootman & Berridge, 1995; Berridge *et al.*, 2000)

Atualmente, considera-se o distúrbio do controle da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  como um evento patogênico central resultante da ação miotóxica de venenos ofídicos, iniciando um processo em cascata que leva a degeneração muscular, tendo assim sido proposto como o principal foco atual de estudo desse campo de pesquisa (Montecucco *et al.*, 2008).

### 1.5 ATPases do tipo P envolvidas no processo

As ATPases do tipo P constituem uma superfamília que catalisa a hidrólise do ATP para transportar cátions contra seus gradientes eletroquímicos, sendo, em outras palavras, responsáveis pelo transporte ativo de  $\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  através das membranas celulares. Exemplos dessa família, caracterizada pela conservação temporária da energia do ATP na forma de um intermediário fosforilado da enzima (E-P), são a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -

ATPase e  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases. (Blanco & Mercer, 1998; Brini & Carafoli, 2009; Yatime *et al.*, 2009; Figura 7).



**Figura 7. Esquema Post-Albers para o ciclo catalítico geral de transporte iônico das ATPases do tipo P.** Durante a hidrólise de ATP e transporte de íons, podem ocorrer os seguintes estados conformacionais da enzima: (E1) – estado conformacional de alta afinidade pelo íon; (E2) – estado conformacional de baixa afinidade pelo íon (retirado de Kühlbrandt, 2004).

### 1.5.1 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e isoformas

A  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, ou bomba de  $\text{Na}^+$ , é uma proteína localizada na membrana plasmática que mantém baixa a proporção intracelular de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  por transportar 3 íons  $\text{Na}^+$  para fora da célula em troca de 2 íons  $\text{K}^+$ . Dessa forma, mantém o equilíbrio osmótico, o potencial de repouso da membrana, as propriedades excitatórias de células nervosas e musculares, e um sistema de transporte secundário que medeia a translocação de outros íons (por exemplo,  $\text{Ca}^{2+}$ ), substratos (aminoácidos e glicose) e neurotransmissores através da membrana (Blanco & Mercer, 1998). Ela pertence ao subgrupo IIC da família das ATPases. As propriedades catalíticas e de transporte da enzima estão associadas à subunidade  $\alpha$ , uma proteína com 10 domínios transmembranares, que contém sítios de ligação para o ATP, cátions e para inibidores específicos classicamente conhecidos como esteróides cardiotônicos (p.ex., digoxina e ouabaína). A subunidade  $\beta$  tem função regulatória, sendo essencial para atividade normal da enzima, podendo estar envolvida na modulação da afinidade por  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ ; além disso, ela pode agir como uma chaperona, favorecendo o ancoramento do peptídeo-

$\alpha$  na membrana. É interessante ressaltar que existe uma íntima relação entre a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . A inibição enzimática resulta no aumento dessa concentração por redução da atividade do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX), sendo, portanto, a  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase um ator importante na homeostasia da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . (Blanco & Mercer, 1998; Mobasher *et al*, 2000). O NCX (localizado na membrana plasmática) catalisa a entrada de 3 íons  $\text{Na}^+$  pela saída de 1 íon  $\text{Ca}^{2+}$ , e essa troca depende da ação do gradiente de  $\text{Na}^+$  gerado pela  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (Martonosi & Pikula, 2003).

Existem 4 isoformas para a subunidade  $\alpha$  e 3 isoformas para a  $\beta$ :  $\alpha 1$  e  $\beta 1$  são encontradas em todas as células;  $\alpha 2$  está presente no sistema nervoso, adipócitos e regula a contratilidade do músculo liso, músculo cardíaco e esquelético;  $\alpha 3$  em neurônios;  $\alpha 4$  somente em testículos, mais especificamente nos espermatozóides;  $\beta 2$  é expressa em tecidos nervosos, glândula pineal e no músculo esquelético;  $\beta 3$  nos pulmões, fígado, retina, músculo esquelético e testículos. (Blanco & Mercer, 1998; Tokhtaeva *et al*, 2012)

### 1.5.2 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases

As  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases, ou bombas de  $\text{Ca}^{2+}$ , também são proteínas integrais de membrana responsáveis pelo controle das vias de  $\text{Ca}^{2+}$  reduzindo rapidamente a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Elas estão localizadas na membrana do retículo sarco-endoplasmático (SERCA), no complexo de Golgi (SPCA) e na membrana plasmática (PMCA), sendo do subgrupo IIA (SERCA e SPCA) e IIB (PMCA) da grande família das ATPases. Dentre elas, as  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases do tipo SERCA são essenciais para o processo de relaxamento muscular, sendo portanto melhor descritas a seguir.

Nas células musculares esqueléticas o principal agente que controla a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  é a SERCA, que transporta 2 íons  $\text{Ca}^{2+}$  por ATP hidrolisado em contra-transporte ao  $\text{H}^+$ , atuando na remoção de  $\text{Ca}^{2+}$  do citosol após o processo contrátil e manutenção de baixas  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  basais durante o período de repouso, sendo importante para o processo de relaxamento das fibras musculares. A SERCA possui diferentes isoformas, apresentando 10 domínios transmembranares com cerca de 110 kDa, e diferem nos domínios catalítico e na região C-terminal: SERCA1a e SERCA1b, ambas expressas de modo predominante em músculos esqueléticos de contração rápida, adultos e fetais/neonatais, respectivamente; SERCA2a, proteína característica da musculatura cardíaca, lisa e esquelética de contração lenta, e SERCA2b, onipresente, encontradas em baixos níveis em músculos de contração lenta; e,

SERCA3, encontradas em um número limitado em células não-musculares (plaquetas, endoteliais, linfóides e mastócitos) (Zador *et al.*, 1996; Mendler *et al.*, 1998; Zador & Wuytack, 2003; Brini & Carafoli, 2009; Periasamy & Huke, 2001; Prasad *et al.*, 2004; De Luca *et al.*, 1998; Lytton *et al.*, 1992). Além disso, é importante destacar que o pH pode afetar a afinidade dessas isoformas pelo  $\text{Ca}^{2+}$ , tomando-se como exemplo o fato de que a acidificação do meio diminui a afinidade pelo íon, diminuindo a velocidade máxima de hidrólise e de captação de  $\text{Ca}^{2+}$  nas isoformas (Woloshner *et al.*, 1997).

A SERCA pode ser regulada pela ação do fosfolamban, que interage reversivelmente com ela, de modo que o  $\text{Ca}^{2+}$  é sequestrado mais rapidamente pelo retículo, ocorrendo como desdobramento disso o relaxamento mais rápido do músculo. Nesse panorama, a forma desfosforilada do fosfolamban inibe a atividade de SERCA, enquanto a forma fosforilada (estimulada pela ação da proteína cinase dependente de AMPc - PKA) promove uma alteração na estrutura de SERCA para a forma ativa com maior facilidade. Opondo-se a isso, a sarcolipina (proteína endógena encontrada no retículo sarcoplasmático) pode diminuir a afinidade da SERCA pelo íon  $\text{Ca}^{2+}$ , inibindo sua atividade enzimática (Koss & Kranias, 1996; Marin *et al.*, 1999; Vanghluwe *et al.*, 2005). Outro inibidor seletivo de SERCA é a tapsigargina (Zádor *et al.*, 2011).

Recentemente, mostramos que a administração perimuscular do veneno bruto de *B. jararacussu* na pata posterior de camundongos (Schaffazick *et al.*, 2010) produz como resposta imediata no músculo *Extensor digitorum longus* (músculo esquelético que contém fibras glicolíticas rápidas do tipo II) (Gutiérrez & Ownby, 2003):

- ✓ diminuição da expressão protéica da isoforma majoritária de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase SERCA1 e da atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica total
- ✓ aumento da expressão da isoforma minoritária SERCA2 e da isoforma  $\alpha 1$  da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Um perfil semelhante foi seguido pela isoforma  $\alpha 2$  da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase
- ✓ *In vitro*, a atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica, mas não  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPásica, foi inibida de modo concentração-dependente pelo veneno.

Nesse panorama, sugerimos que durante o processo degenerativo os componentes do veneno teriam a capacidade de penetrar no miócito e inibir diretamente a atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica do retículo sarcoplasmático, além de causar proteólise de SERCA1, possivelmente

intensificando o comprometimento do controle da  $[Ca^{2+}]_i$ . As alterações de expressão observadas para SERCA2 e  $Na^+/K^+$ -ATPase poderiam ser uma tentativa de compensação (Schaffazick *et al.*, 2010). Entretanto, ainda não se sabe quais componentes do veneno são responsáveis por esses efeitos, o que é de grande importância na determinação de alvos moleculares que possam ser neutralizados terapêuticamente.

## 2. OBJETIVO

Este trabalho tem o propósito de estudar a ação das miotoxinas BthTXI e BthTXII (isoladas e associadas), através da observação de seus efeitos nas ATPases de transporte iônico SERCA e Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase e em suas isoformas durante o processo de necrose/regeneração do EDL de camundongos. Também será avaliada a capacidade dessas miotoxinas afetarem a atividade de tais ATPases *in vitro*..

### Objetivos Específicos

1. Avaliação da expressão protéica das isoformas  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase e SERCA1 e SERCA2 através de Western blot nas preparações de EDL exposto às miotoxinas;
2. Avaliação da atividade Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPásica e Ca<sup>2+</sup>-ATPásica por espectrofotometria nas preparações de EDL exposto às miotoxinas;
3. Avaliação da ação das miotoxinas *in vitro* sobre a atividade Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPásica e Ca<sup>2+</sup>-ATPásica de preparações membranares ricas nessas enzimas.

### 3. MATERIAIS E METODOLOGIA

#### 3.1 Reagentes

Da firma Sigma Chemical Company (EUA) foram obtidos o ATP, o Ponceau S. Os reagentes utilizados na eletroforese e Western blot foram adquiridos da Bioagency (Brasil). O sistema de quimiluminescência Supersignal West Pico e o filme radiográfico CL-Xposure foram adquiridos da Pierce (EUA), a albumina da Merck (EUA) e o leite Molico<sup>®</sup> desnatado da Nestlé do Brasil. As soluções de revelação e fixação foram obtidas da empresa Kodak (EUA).

As miotoxinas BthTX I e BthTX II foram cedidas pela Professora Adélia Cintra (Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP- Ribeirão Preto).

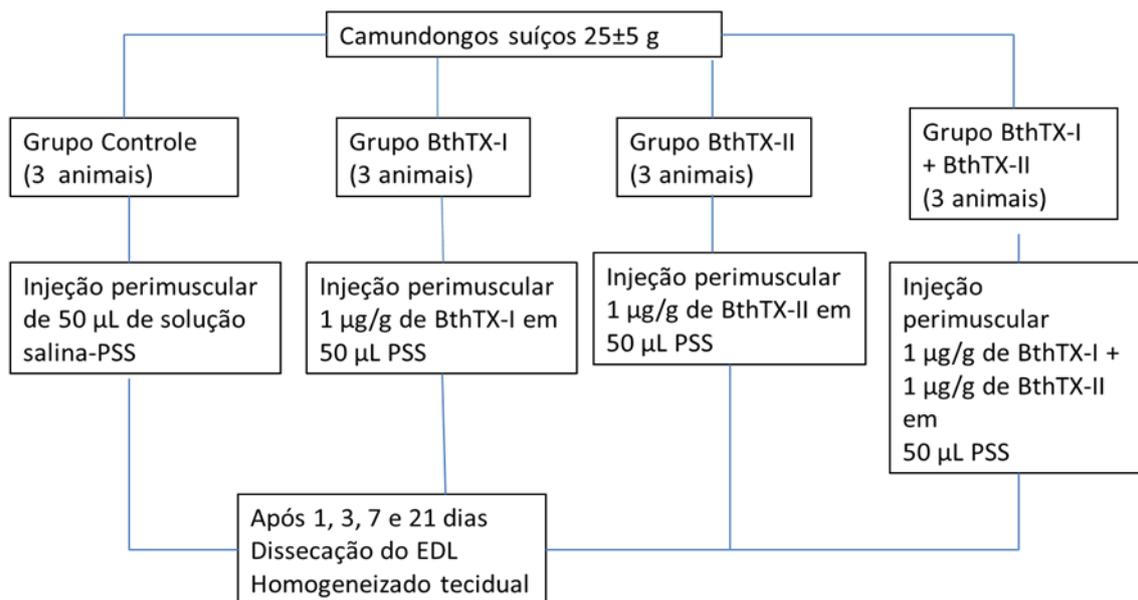
Os anticorpos foram provenientes das firmas EMD Millipore e Santa Cruz Biotechnology (EUA) - anti-Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha_1$ ; Upstate Biotechnology (EUA) - anti-Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha_2$ ; Calbiochem-Novabiochem (EUA) - anti-SERCA1 e 2; Santa Cruz Biotechnology - anticorpos secundários anti-coelho ou anti-camundongo.

Soluções de Ca<sup>2+</sup> utilizadas nos experimentos de atividade Ca<sup>2+</sup>-ATPásica foram calculadas de acordo com a concentração de Ca<sup>2+</sup> livre desejada no meio de incubação, utilizando-se EGTA como agente quelante, e foi calculada segundo as constantes de Orentlincher para CaEGTA e MgEGTA, com o auxílio do Software Mcalc (Fabiato & Fabiato, 1979).

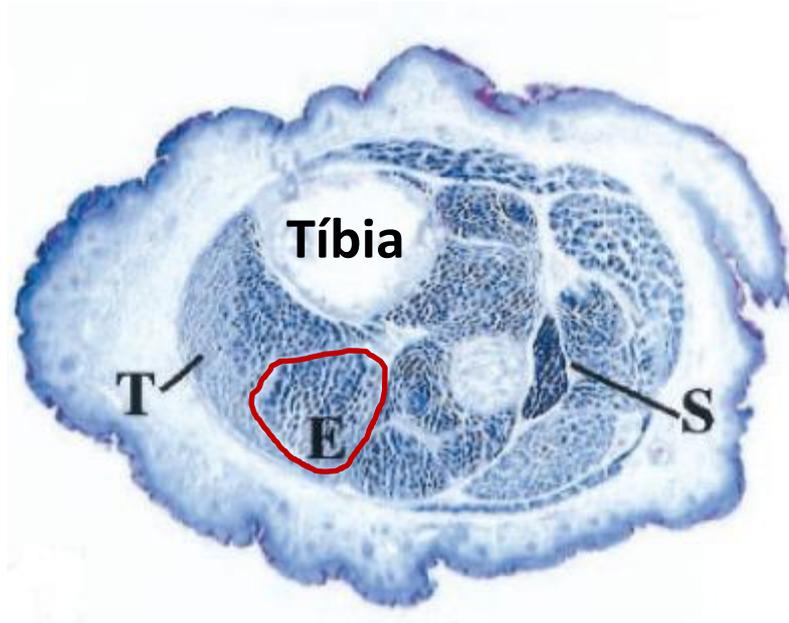
#### 3.2 Administração das miotoxinas

A figura 8 mostra os grupos experimentais e tratamento dos camundongos suíços albinos machos e fêmeas adultos, pesando entre  $25 \pm 5$  g que foram divididos aleatoriamente em 4 grupos, com 3 animais cada: Controle, BthTXI, BthTXII e BthTXI+II. Após anestesia, os grupos BthTXI, BthTXII e BthTXI+II receberam injeção perimuscular das respectivas toxinas na pata direita (1  $\mu\text{g/g}$  em 50  $\mu\text{l}$  de solução salina fisiológica – PSS – para BthTXI e BthTXII ou 1  $\mu\text{g/g}$  de cada toxina em 50  $\mu\text{l}$  de PSS para BthTXI+II), onde a solução foi administrada de forma que banhasse o músculo externamente (administração pela via perimuscular, como observado na figura 9), não ocorrendo lesão mecânica (Schaffazick *et*

*al.*, 2010). Cabe destacar que utilizamos 1µg/g das miotoxinas, pois esta foi a concentração de veneno bruto testada em EDL de camundongos nos experimentos conduzidos por Schaffazick *et al.*, 2010. O grupo controle recebeu somente a injeção de PSS na pata direita (50 µl). Essa etapa foi realizada no Laboratório de Farmacologia das Toxinas e Substâncias Antagonistas, pelo Dr. Marcelo Amorim. A metodologia empregada foi aprovada pela Comissão de Ética com Uso de Animais do CCS, UFRJ (CEUA-CCS, protocolo DFBCICB022).



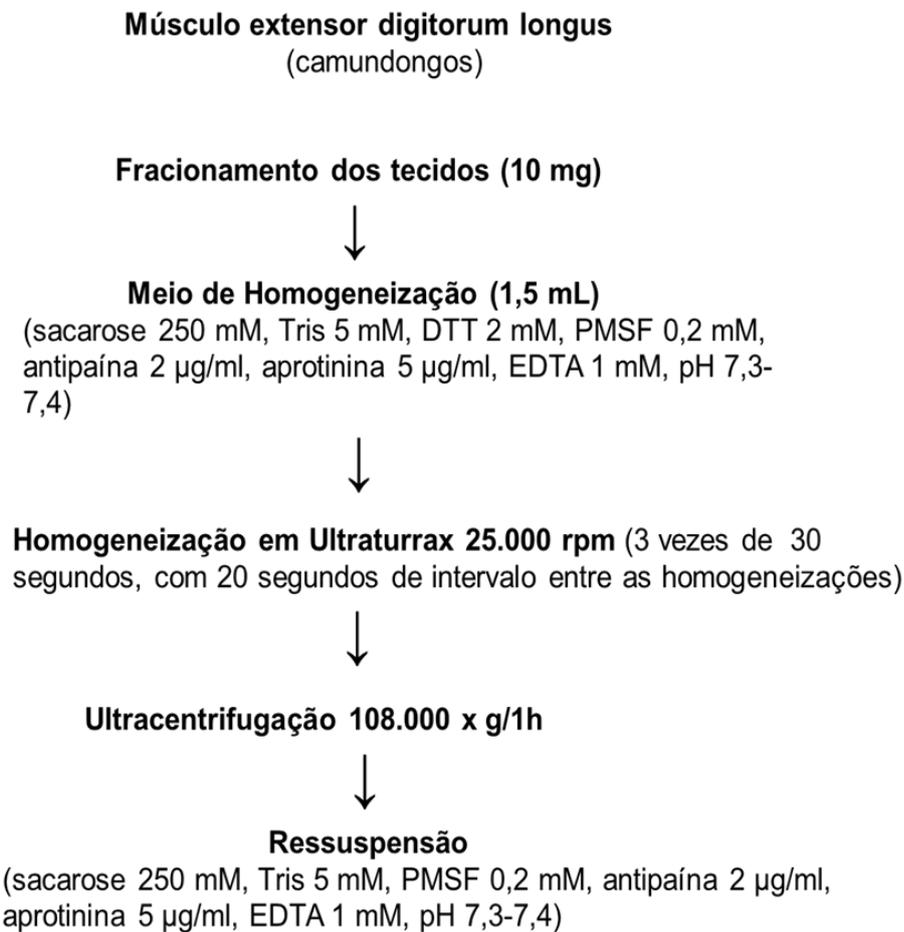
**Figura 8. Esquema representativo da administração das miotoxinas.**



**Figura 9. Corte transversal da pata de camundongo.** Músculos E = *extensor digitorum longus*, T= *tiabialis*, S = *soleus*. A referência para colocar a agulha é a tíbia (retirada de Calvo *et al*, 2001).

### 3.3 Preparação do Músculo *Extensor Digitorum Longus* (EDL)

Conforme descrito por Schaffazick e colaboradores (2010), em intervalos de 1, 3, 7 e 21 dias após a injeção das toxinas, os camundongos foram sacrificados por exposição etérea. Os músculos EDL foram dissecados, secos com papel de filtro, pesados (aproximadamente 10 mg) e armazenados a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Pelo fato do EDL de camundongo ser muito pequeno, as preparações eram limitadas; desse modo, foi necessário um grande número de animais para realizarmos os experimentos (para obtenção de um “n” são necessários 3 músculos EDL). Para a preparação membranar, os músculos foram cortados em pequenos pedaços e homogeneizados em 1,5 mL de meio de homogeneização (na proporção de 1 g de EDL para 8 mL de meio de homogeneização) contendo: sacarose 250 mM, Tris 5 mM, ditioneitol (DTT) 2 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) 0,2 mM, antipaína 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , aprotinina 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM (pH 7,3-7,4). A homogeneização foi realizada com Ultraturrax na velocidade de 25.000 rpm (3 vezes de 30 segundos, com 20 segundos de intervalo entre as homogeneizações) e os homogeneizados foram submetidos a uma centrifugação de 108.000  $g/1$  h. Descartado todo o sobrenadante, o precipitado restante foi ressuspenso em mesmo meio sem DTT e armazenado em criotubos a  $-70^{\circ}\text{C}$  (Figura 10).



**Figura 10.** Esquema representativo da preparação de EDL de camundongos utilizada nos experimentos.

### 3.4 Dosagem de proteína

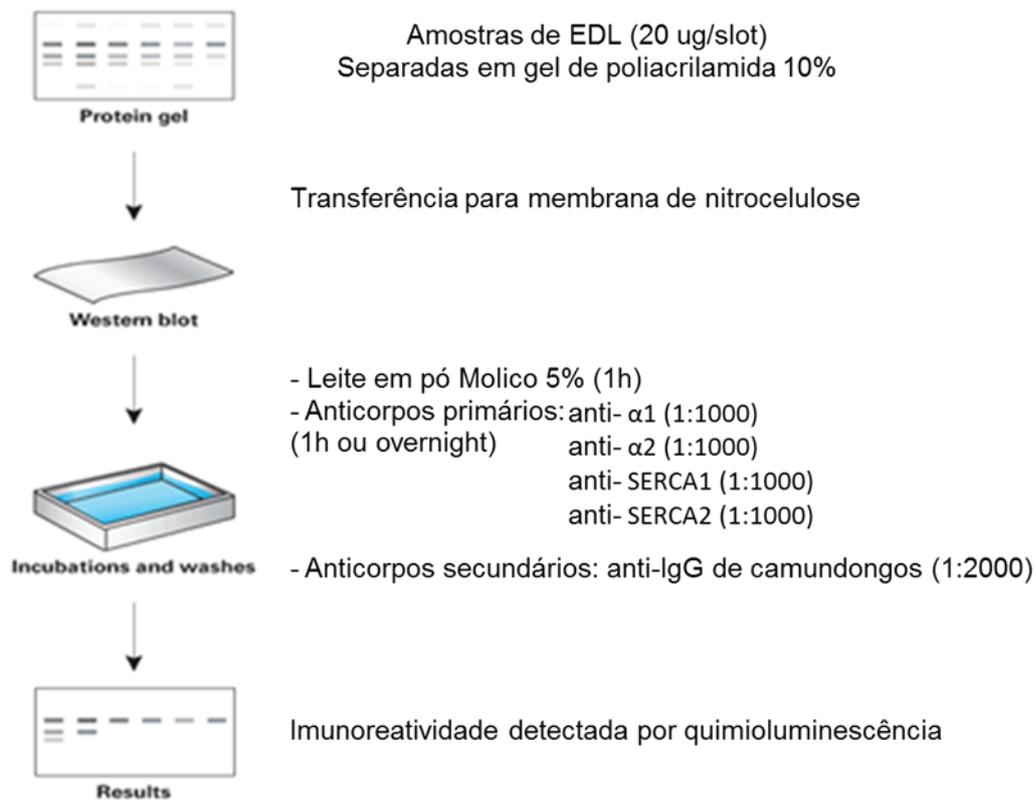
O conteúdo de proteína das preparações de homogeneizado de EDL foi determinado através do método de Lowry miniaturizado (em microplaca) usando-se albumina sérica bovina como padrão. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de placa (Tecan, EUA) e o teor de proteína das amostras foi expresso em mg de proteína/mL, estimado pela equação da reta de regressão linear dos padrões.

### 3.5 Ensaio de SDS-PAGE e Western Blot

Para avaliação da expressão proteica das ATPases que são objeto desse estudo, as amostras contendo 20  $\mu\text{g}$  de proteína foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 10%, com amperagem constante de 40 mA; em seguida, transferidas por 1 h para papel de nitrocelulose, com a voltagem constante de 90 V. Após incubação por 1 h em leite em pó desnatado (5 %) diluído em tampão Tris-salina contendo 0,1% de Tween 20 (TTBS), as membranas foram lavadas com TTBS e incubadas por 1 h em temperatura ambiente ou *overnight* à 4°C, com anticorpos primários monoclonais específicos para as isoformas  $\alpha 1$  ou  $\alpha 2$  da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase ou SERCA1 ou 2 (diluições 1:1000). Após lavagens com TTBS, as membranas foram incubadas por mais 1 h com anticorpos secundários anti-IgG de camundongo ou de coelho (diluições 1:2000), em seguida, foi feita novamente lavagens com TTBS (figura 11). Após a rinsagem por 5 min com solução de quimiluminescência, as imunomarcações na membrana foram detectadas através de exposição com filme radiográfico de alta sensibilidade (Schaffazick *et al.*, 2010). A análise densitométrica das bandas foi realizada pelo software Image J (NIH, EUA). O controle de carregamento proteico foi realizado pela análise densitométrica das raias coradas com vermelho de Ponceau, conforme outros estudos (Barreto *et al.*, 2010; Rezende *et al.*, 2013).

### 3.6 Ensaio de atividade $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPásica e $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica

A atividade enzimática para ambas ATPases foi realizada pelo método de Fiske & Subbarow (1925), através da medida da quantidade de fosfato inorgânico liberado pela hidrólise enzimática do ATP (em  $\mu\text{mol Pi/mg}$  proteína/h) utilizando meios de incubação específicos (Schaffazick *et al.*, 2010). Suscintamente:



**Figura 11. Modelo esquemático de ensaio de eletroforese e Western Blot.**

### 3.6.1 Atividade $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPásica e $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica *in vivo*

A reação iniciou-se pela adição de proteína (10-25 µg de EDL de camundongos tratados com as miotoxinas) em meio contendo, para a atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPásica, NaCl 84 mM,  $\text{MgCl}_2$  3 mM,  $\text{ATPNa}_2$  1,2 mM, EGTA 2,5 mM, azida 10 mM, tampão maleato-Tris 20 mM (37°C, pH 7,4), além de KCl 3 mM (atividade total) ou ouabaína 1 mM (atividade ouabaína-resistente) e, para a atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica, EGTA 0,3 mM,  $\text{NaN}_3$  10 mM,  $\text{MgCl}_2$  4 mM, KCl 60 mM, Tris-HEPES 50 mM (pH 7,4),  $\text{ATPNa}_2$  5 mM, na presença (atividade total) ou ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  livre 10 µM (atividade básica). A reação foi finalizada pela adição da solução de Fiske e Subbarow gelada após 1 h de incubação. A leitura da reação colorimétrica foi feita em espectrofotômetro a 650 nm. A atividade específica  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPásica foi obtida pela medida do valor referente à atividade ATPásica total subtraída do valor da atividade inibida pela presença de ouabaína. A atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica (estimulada

pelo  $\text{Ca}^{2+}$ ) foi calculada subtraindo-se o valor de atividade medida na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  (atividade basal) do valor da atividade medida na presença desse íon (atividade total).

### 3.6.2 Inibição da atividade $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPásica e $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica *in vitro*

Iniciou-se pela adição de proteína de preparações ricas em  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (hemisfério cerebral - isoformas  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$  - e tecido renal - isoforma  $\alpha 1$  - de rato) e  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (EDL de rato) no mesmo meio de incubação utilizado para avaliação da atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPásica e  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica *in vivo* (como descrito acima), respectivamente. No entanto, adicionou-se ao meio de incubação as miotoxinas isoladas ou associadas na concentração de 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPásica) ou de 0,1, 1,0 e 10,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica). A reação foi finalizada pela adição de 1 mL da solução de Fiske e Subbarow gelada após 1 h de incubação. A leitura da reação colorimétrica foi feita em espectrofotômetro, no comprimento de onda de luz visível de 650 nm. A atividade específica  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPásica foi obtida pela medida do valor referente à atividade ATPásica total subtraída do valor da atividade inibida pela presença de ouabaína. A atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica (estimulada pelo  $\text{Ca}^{2+}$ ) foi calculada subtraindo-se o valor de atividade medida na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  (atividade basal) do valor da atividade medida na presença desse íon (atividade total).

### 3.7 Tratamento Estatístico

Os valores densitométricos das bandas nos ensaios de Western Blotting foram agrupados e analisados no programa GraphPad Prism pelo teste ANOVA com um fator (verificando a variação geral), seguido do pós-teste de Tukey (verificando a variação entre os grupos). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Os dados representam os resultados de pelo menos três experimentos independentes e foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Para avaliação da atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica e  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPásica *in vitro* foi utilizado o mesmo teste estatístico de t de Student, apresentando significância quando  $p < 0,05$ . Para atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica *in vivo*, foi utilizado o teste ANOVA com um fator, seguido do pós-teste de Tukey, apresentando

valores significativos quando  $p < 0,05$ , sendo apresentados na forma de média  $\pm$  EPM em valores percentuais.

## 4. RESULTADOS

Com o objetivo de comparar a ação das miotoxinas isoladas e associadas com os resultados publicados para o veneno bruto da serpente *B. jararacussu* (Schaffazick *et al.*, 2010), fizemos o Western blot das isoformas das ATPases do tipo P nos tempos 1, 3, 7 e 21 dias após a injeção perimuscular. Conforme a obtenção dos dados, notamos que, diferentemente do veneno bruto, poucas alterações foram evidentes durante os primeiros dias de degeneração muscular e basicamente nenhuma modificação de expressão proteica foi observada nos experimentos preliminares com 7 e 21 dias. Dessa forma, focamos no estudo das ATPases ao longo do período crítico do processo degenerativo (1 e 3 dias) e que são mostrados a seguir.

### 4.1 Ensaio de Western Blot para avaliação da expressão de proteínas

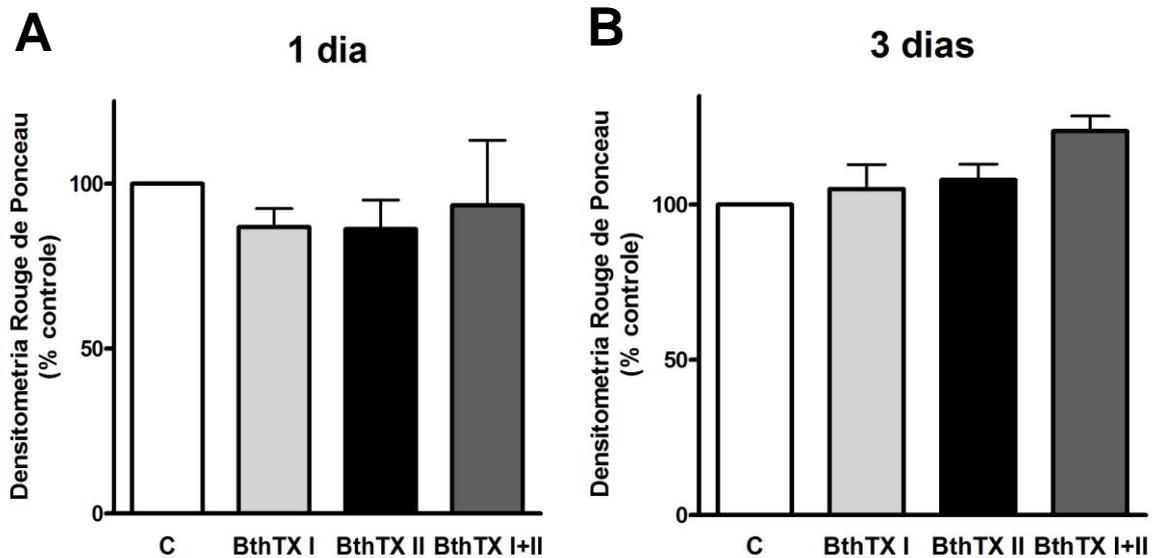
Com o objetivo de se avaliar o padrão de expressão de proteínas-alvo no EDL, foram realizados ensaios de separação eletroforética das proteínas, seguido de imunomarcagem com anticorpos específicos dirigidos a cada uma das proteínas de interesse. Para nos assegurarmos que não existem diferenças significativas de carregamento, nem possíveis falhas decorrentes do procedimento de dosagem de proteínas, foi efetuada a incubação das membranas de nitrocelulose em corante Rouge de Ponceau, já demonstrado como método eficaz de controle desses parâmetros (Romero-Calvo *et al.*, 2010). Desse modo, ficou claro que em 1 (Fig. 12A) e 3 dias (figura 12B) não há diferenças significativas da quantidade de proteína total entre os grupos.

### 4.2 Expressão das isoformas SERCA1 e 2 da $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase no músculo EDL 1 e 3 dias após injeção perimuscular das miotoxinas BthTX I e/ou BthTX II

A isoforma SERCA1 é predominante no EDL e nosso grupo mostrou anteriormente que o veneno bruto promove uma diminuição significativa de sua expressão no período de 1 e 3 dias após injetado (Schaffazick *et al.*, 2010).

Diferentemente, nos experimentos realizados no presente trabalho, observamos que as miotoxinas BthTX I, BthTX II e BthTX I+II não foram capazes de promover modificações

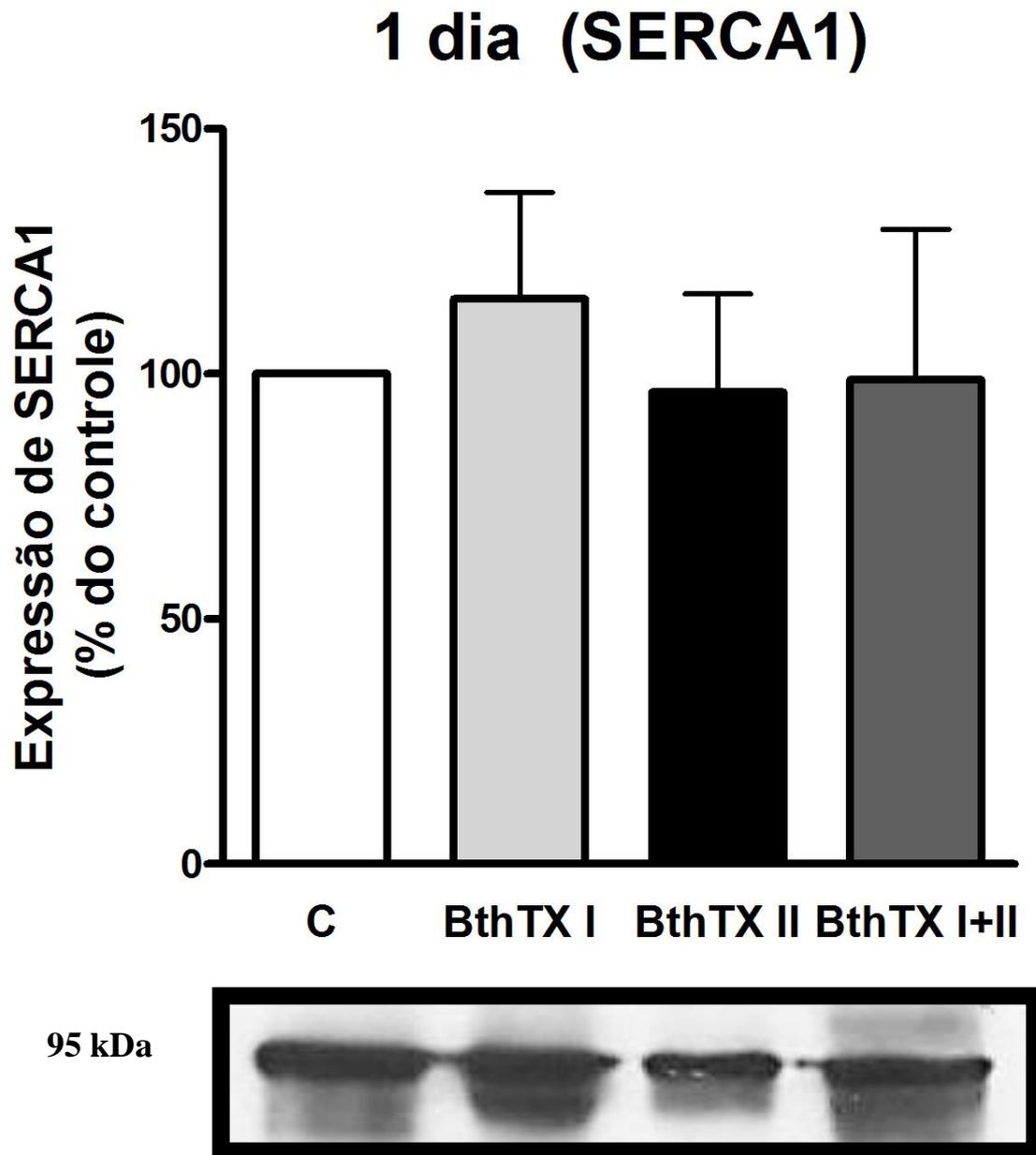
significativas na expressão dessa isoforma de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase no período de 1 dia (figura 13) e 3 dias (figura 14) pós-injeção.



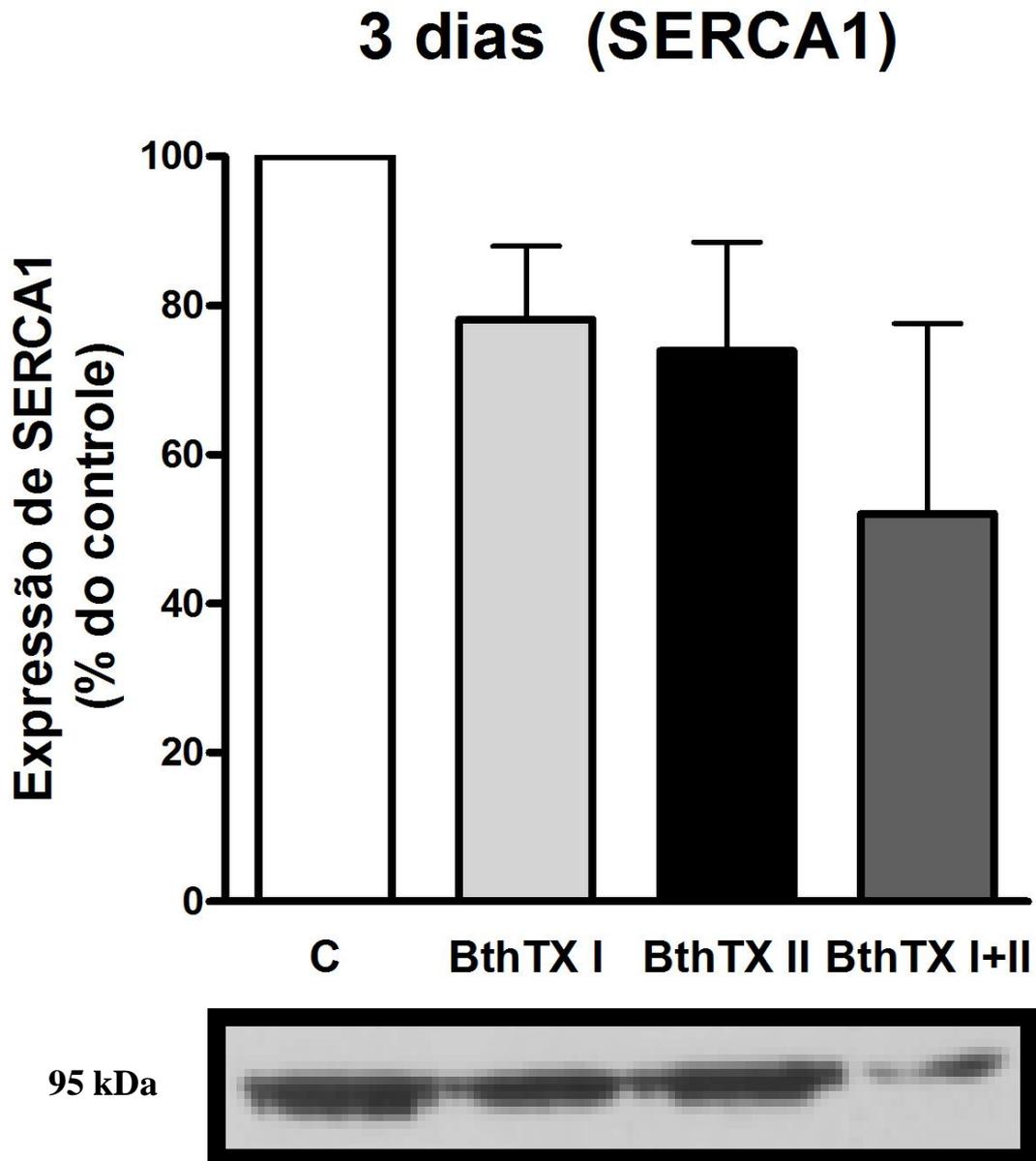
**Fig. 12. Análise densitométrica das raias de proteína na membrana de nitrocelulose após as etapas de eletrotransferência e incubação com corante Rouge de Ponceau.** O gráfico apresenta a quantificação por densitometria dos diferentes grupos experimentais 1 (A) e 3 dias (B) após a indução de mionecrose pelas miotoxinas BthTX I (1  $\mu\text{g/g}$ ), BthTX II (1  $\mu\text{g/g}$ ) e BthTX I+II (1  $\mu\text{g/g}$  de cada). Os valores são a média  $\pm$  EPM de 3-7 amostras independentes. C = grupo controle. O mesmo procedimento foi realizado em cada um dos experimentos realizados; ns – não significativo.

No músculo esquelético de contração rápida como o EDL, SERCA2 é uma isoforma minoritária, sendo não mais que 10% da população total de SERCA em ratos e camundongos quando analisado o RNAm (Mendler *et al.*, 1998; Vangheluwe *et al.*, 2005). Os dados publicados (Schaffazick *et al.*, 2010) mostraram que o veneno bruto promove um aumento significativo na expressão da isoforma SERCA2, no período de 1 e 3 dias pós-injeção, provavelmente como uma tentativa de compensação pela diminuição da atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica total.

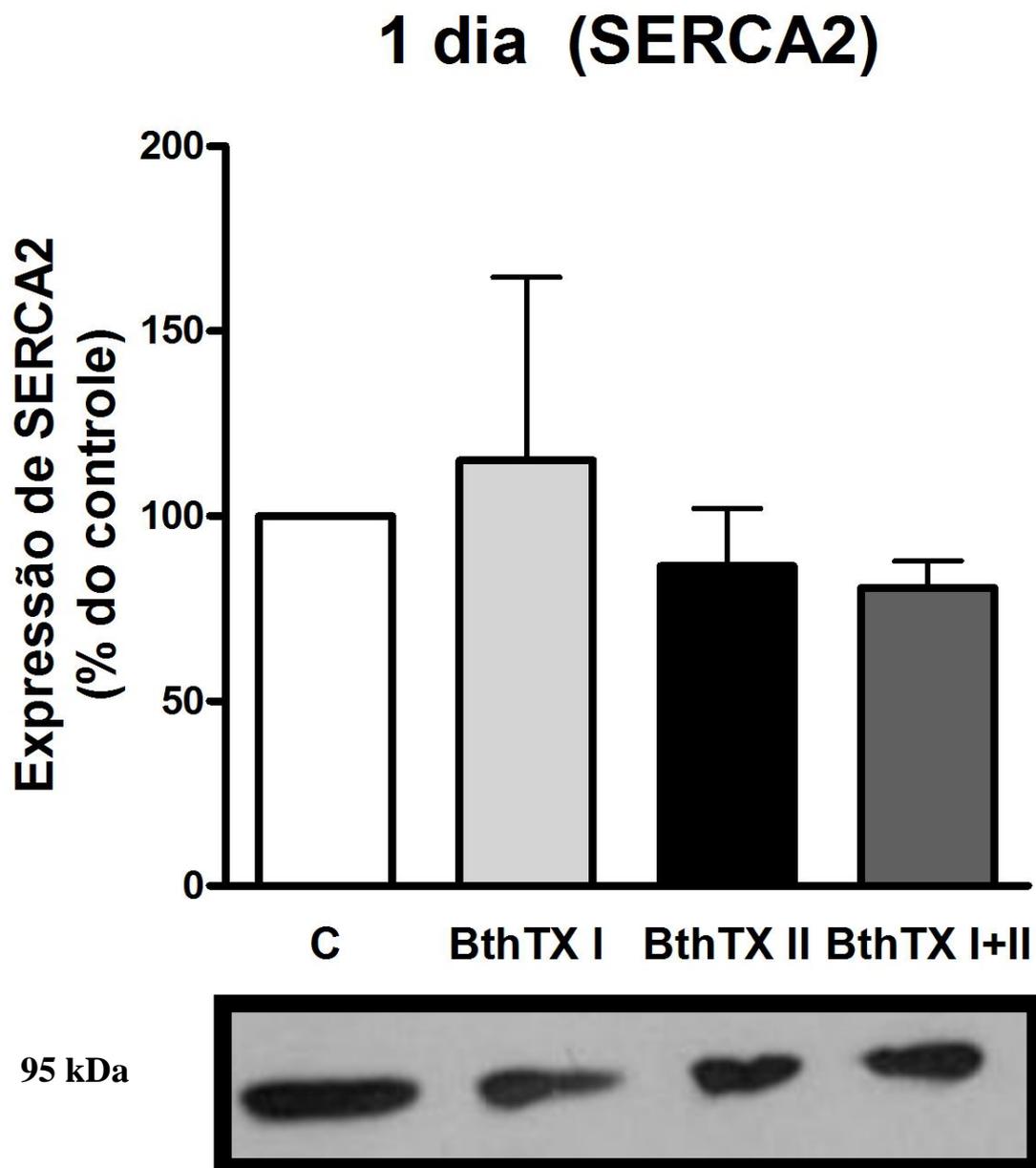
Como apresentado nas figuras 15 e 16, as miotoxinas BthTX I, BthTX II e BthTX I+II não foram capazes de promover modificações significativas estatisticamente na expressão dessa isoforma de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase no período de 1 e 3 dias, respectivamente.



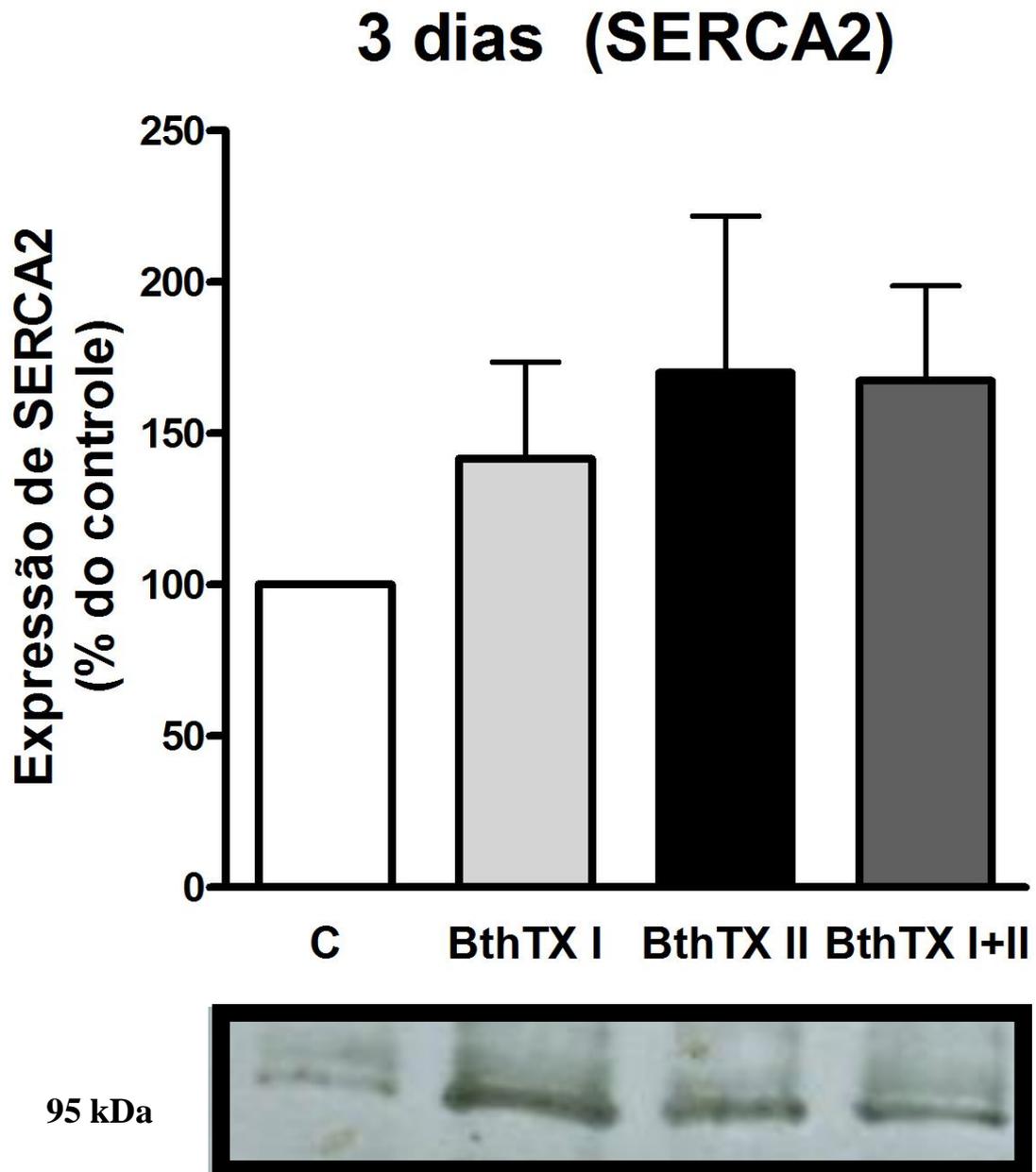
**Figura 13.** Expressão da isoforma SERCA1, 1 dia após a indução de mionecrose pelas miotoxinas BthTX I (1  $\mu\text{g/g}$ ), BthTX II (1  $\mu\text{g/g}$ ) e BthTX I+II (1  $\mu\text{g/g}$  de cada). O Western blot típico mostra as bandas específicas imunomarcadas, após adição do anticorpo primário (mouse anti-SERCA1, dil. 1:1000) e do anticorpo secundário (anti-mouse, dil. 1:2000). O gráfico apresenta a quantificação por análise densitométrica da expressão da isoforma SERCA1. Os valores são a média  $\pm$  EPM de 5-7 amostras independentes. C = grupo controle.



**Figura 14.** Expressão da isoforma SERCA1, 3 dias após a indução de mionecrose pelas miotoxinas BthTX I (1  $\mu\text{g/g}$ ), BthTX II (1  $\mu\text{g/g}$ ) e BthTX I+II (1  $\mu\text{g/g}$  de cada). O Western blot típico mostra as bandas específicas imunomarcadas, após adição do anticorpo primário (mouse anti-SERCA1, dil. 1:1000) e do anticorpo secundário (anti-mouse, dil. 1:2000). O gráfico apresenta a quantificação por análise densitométrica da expressão da isoforma SERCA1. Os valores são a média  $\pm$  EPM de 3-6 amostras independentes. C = grupo controle.



**Figura 15.** Expressão da isoforma SERCA2, 1 dia após a indução de mionecrose pelas miotoxinas BthTX I (1  $\mu\text{g/g}$ ), BthTX II (1  $\mu\text{g/g}$ ) e BthTX I+II (1  $\mu\text{g/g}$  de cada). O Western blot típico mostra as bandas específicas imunomarcadas, após adição do anticorpo primário (mouse anti-SERCA2, dil. 1:1000) e do anticorpo secundário (anti-mouse, dil. 1:2000). O gráfico apresenta a quantificação por análise densitométrica da expressão da isoforma SERCA2. Os valores são a média  $\pm$  EPM de 3-5 amostras independentes. C = grupo controle.



**Figura 16.** Expressão da isoforma SERCA2, 3 dias após a indução de mionecrose pelas miotoxinas BthTX I (1  $\mu\text{g/g}$ ), BthTX II (1  $\mu\text{g/g}$ ) e BthTX I+II (1  $\mu\text{g/g}$  de cada). O Western blot típico mostra as bandas específicas imunomarcadas, após adição do anticorpo primário (mouse anti-SERCA2, dil. 1:1000) e do anticorpo secundário (anti-mouse, dil. 1:2000). O gráfico apresenta a quantificação por análise densitométrica da expressão da isoforma SERCA2. Os valores são a média  $\pm$  EPM de 3-7 amostras independentes. C = grupo controle.

### 4.3 Efeito das miotoxinas BthTX I e/ou BthTX II na atividade $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica *in vivo*

Nosso grupo demonstrou que o veneno bruto foi capaz de reduzir significativamente a atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica do EDL, seguindo de certa forma o que foi observado para a expressão da isoforma predominante SERCA1 (Schaffazick *et al.*, 2010),

A figura 17 mostra que BthTX I parece elevar a atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica 1 dia após a injeção enquanto BthTX II parece não alterar a atividade. Por outro lado, as miotoxinas associadas BthTX I+II inibiram significativamente a atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica nesse período.

No 3º dia após a injeção, as miotoxinas isoladas e associadas não promoveram modificações significativas na atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica (figura 18).

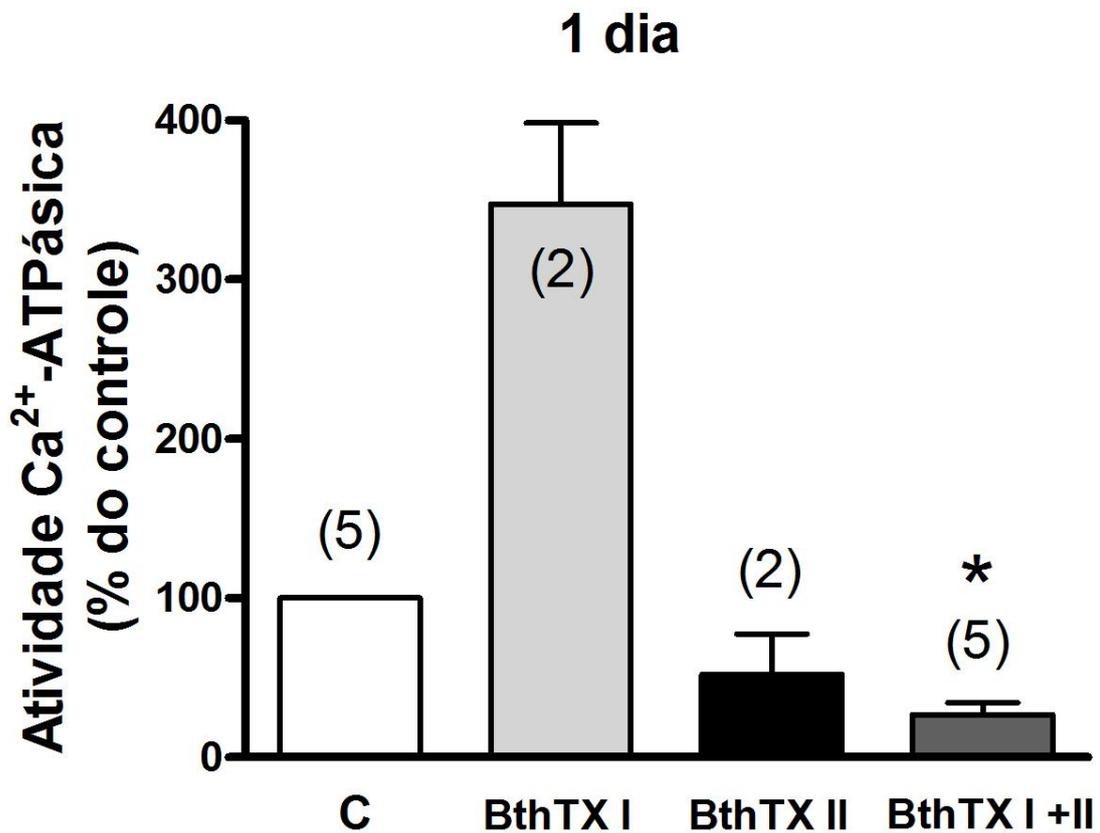


Figura 17. Atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica 1 dia após a indução de mionecrose pelas miotoxinas BthTX I (1  $\mu\text{g/g}$ ), BthTX II (1  $\mu\text{g/g}$ ) e BthTX I+II (1  $\mu\text{g/g}$  de cada). Os valores são média  $\pm$  EPM de (n) amostras independentes. One way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey. \*  $P < 0,05$  em relação a C (grupo controle).

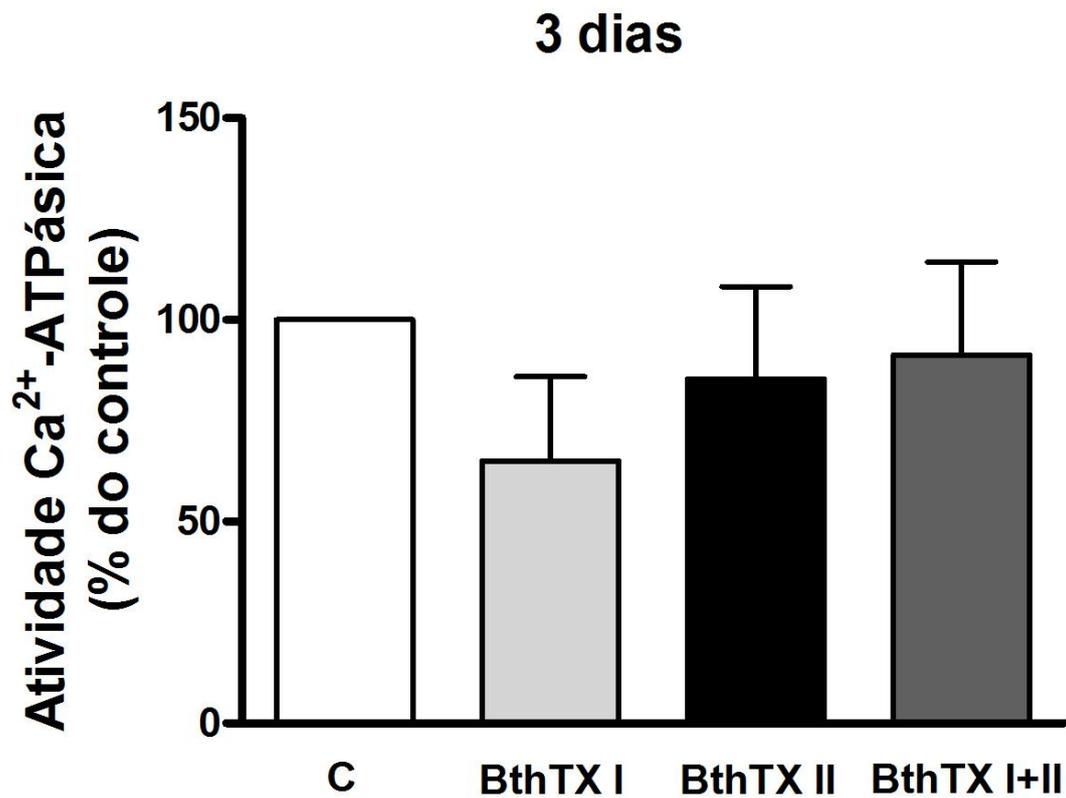
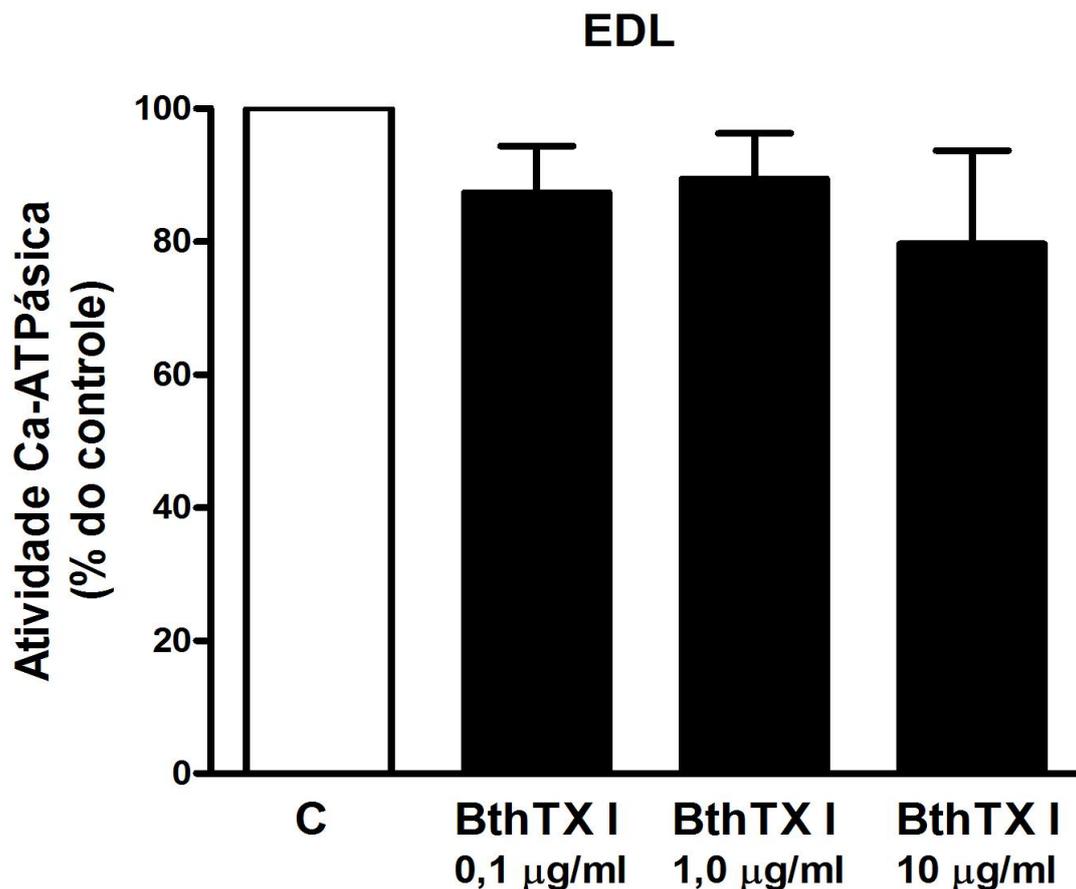


Figura 18. Atividade Ca<sup>2+</sup>-ATPásica 3 dias após a indução de mionecrose pelas miotoxinas BthTX I (1 µg/g), BthTX II (1 µg/g) e BthTX I+II (1 µg/g de cada). Os valores são média ± EPM de 5-7 amostras independentes. C = grupo controle.

#### 4.4 Efeito das miotoxinas BthTX I, BthTX II e BthTX I+II na atividade Ca<sup>2+</sup>-ATPásica *in vitro*

Com o intuito de verificarmos se a função catalítica da Ca<sup>2+</sup>-ATPase poderia ser alterada diretamente na presença das miotoxinas, realizamos ensaios para avaliação de inibição enzimática *in vitro*. Assim, utilizamos preparações de EDL de rato, ricas em Ca<sup>2+</sup>-ATPase de retículo sarcoplasmático (SERCA). Foram escolhidas as mesmas concentrações empregadas nos experimentos com veneno bruto (Schaffazick *et al.*, 2010).

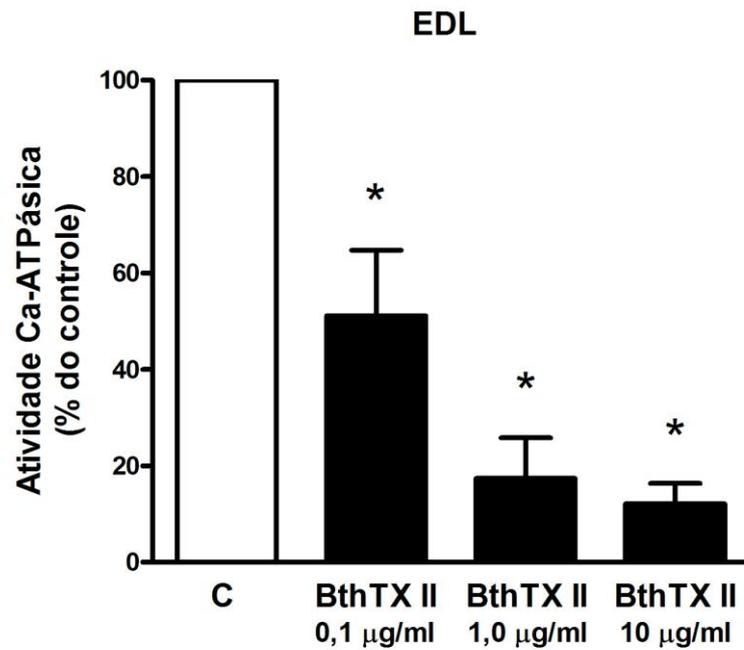
A figura 19 mostra que a BthTX I não foi capaz de promover inibição da atividade Ca<sup>2+</sup>-ATPásica *in vitro*, mesmo em 10 µg/ml, concentração de veneno bruto que inibiu mais de 90% da atividade enzimática (Schaffazick *et al.*, 2010).



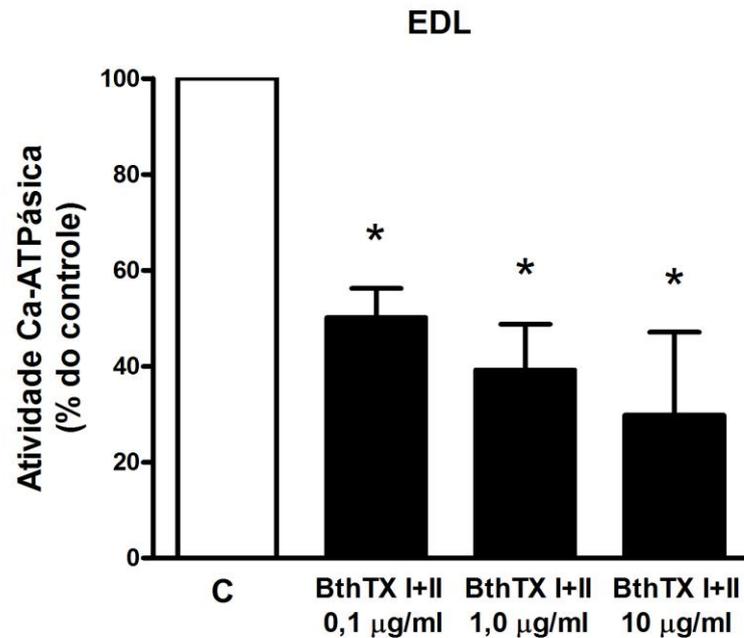
**Figura 19.** Efeito de concentrações crescentes de BthTX I sobre a atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica em preparações de EDL de rato *in vitro*. Os valores são média  $\pm$  EPM de 3 experimentos independentes. C = grupo controle.

Por outro lado, BthTX II foi capaz de inibir de forma concentração-dependente a atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica nas concentrações de 0,1, 1,0 e 10  $\mu\text{g/ml}$  (figura 20). Isso mostra que essa toxina é mais eficiente que o veneno bruto em inibir a atividade enzimática, já que a menor concentração (0,1  $\mu\text{g/ml}$ ) de veneno bruto não foi capaz de inibir a atividade (Schaffazick *et al.*, 2010).

A figura 21 mostra que as miotoxinas associadas BthTX I+II (1:1) também inibiram significativamente, de forma concentração-dependente, a atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica em relação ao controle. No entanto, comparando os efeitos de BthTX II e BthTX I+II mostrados nas figuras 20 e 21, não há diferenças estatisticamente significativas entre elas (figura 22), sugerindo a ausência de potencialização aparente decorrente da associação.



**Figura 20.** Efeito de concentrações crescentes de BthTX II sobre a atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica em preparações de EDL de rato *in vitro*. Os valores são média  $\pm$  EPM de 4 experimentos independentes. One way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey. \*  $P < 0,05$  em relação a C (grupo controle).



**Figura 21.** Efeito de concentrações crescentes de BthTX I+II sobre a atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica em preparações de EDL de rato *in vitro*. Os valores são média  $\pm$  EPM de 3 experimentos independentes. One way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey. \*  $P < 0,05$  em relação a C (grupo controle).

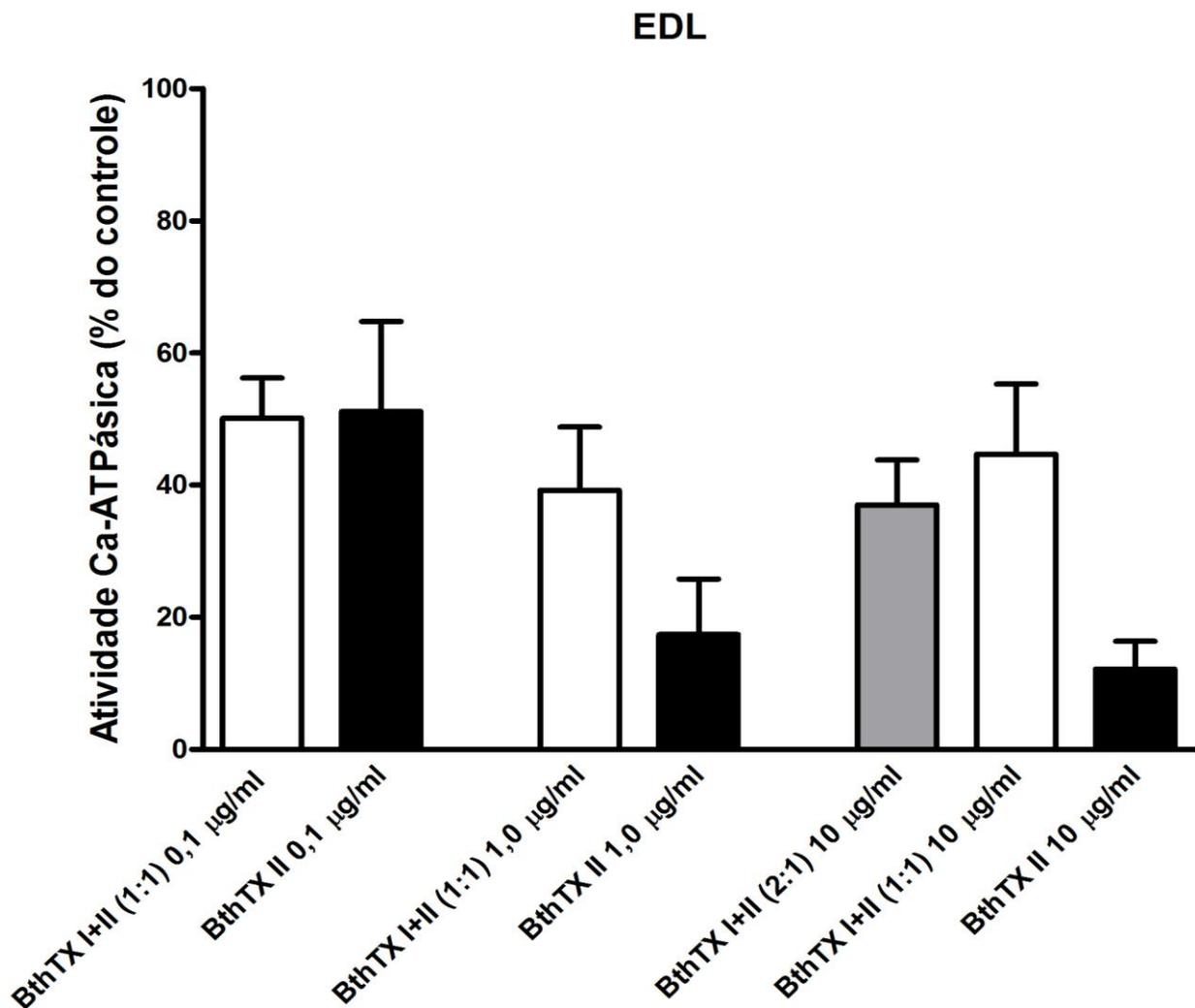


Figura 22. Comparação dos efeitos de BthTX II isolada e BthTX I+II em diferentes concentrações e proporções sobre a atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica em preparações de EDL de rato *in vitro*. Os valores são média  $\pm$  EPM de 3-7 experimentos independentes. C = grupo controle.

#### 4.5 Expressão das isoformas $\alpha 1$ e $\alpha 2$ da $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase no músculo EDL 1 e 3 dias após injeção perimuscular das miotoxinas BthTX I, BthTX II e BthTX I+II

A isoforma  $\alpha 2$  da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase é predominante na musculatura esquelética, e no EDL murino sua densidade chega a quase 90% da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase total (He *et al.*, 2001). De acordo com os resultados obtidos por Schaffazick e colaboradores (2010) com o veneno bruto, observou-se uma tendência de aumento na expressão dessa isoforma no período de 1 a

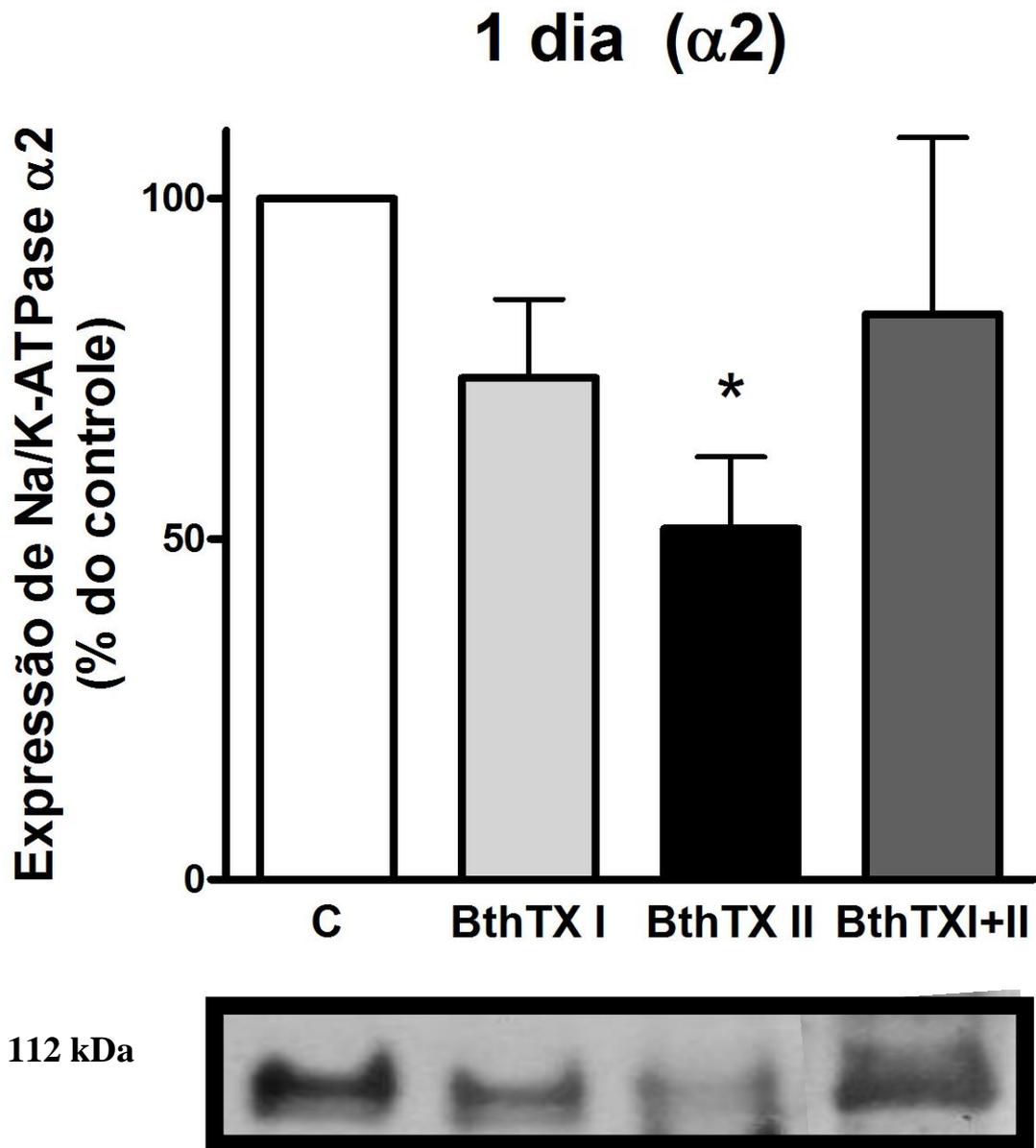
3 dias após sua injeção, que foi atribuído como uma tentativa de compensação da possível elevação da  $[Ca^{2+}]_i$  pela diminuição de SERCA1 e da atividade  $Ca^{2+}$ -ATPásica total.

Com as miotoxinas observa-se um perfil diferente. A figura 23 mostra que 1 dia após a injeção das miotoxinas ocorre uma diminuição significativa na expressão da isoforma  $\alpha 2$  somente na presença de BthTX II isolada. Após 3 dias essa diminuição também é observada na presença da associação de BthTX I+II associadas (Figura 24).

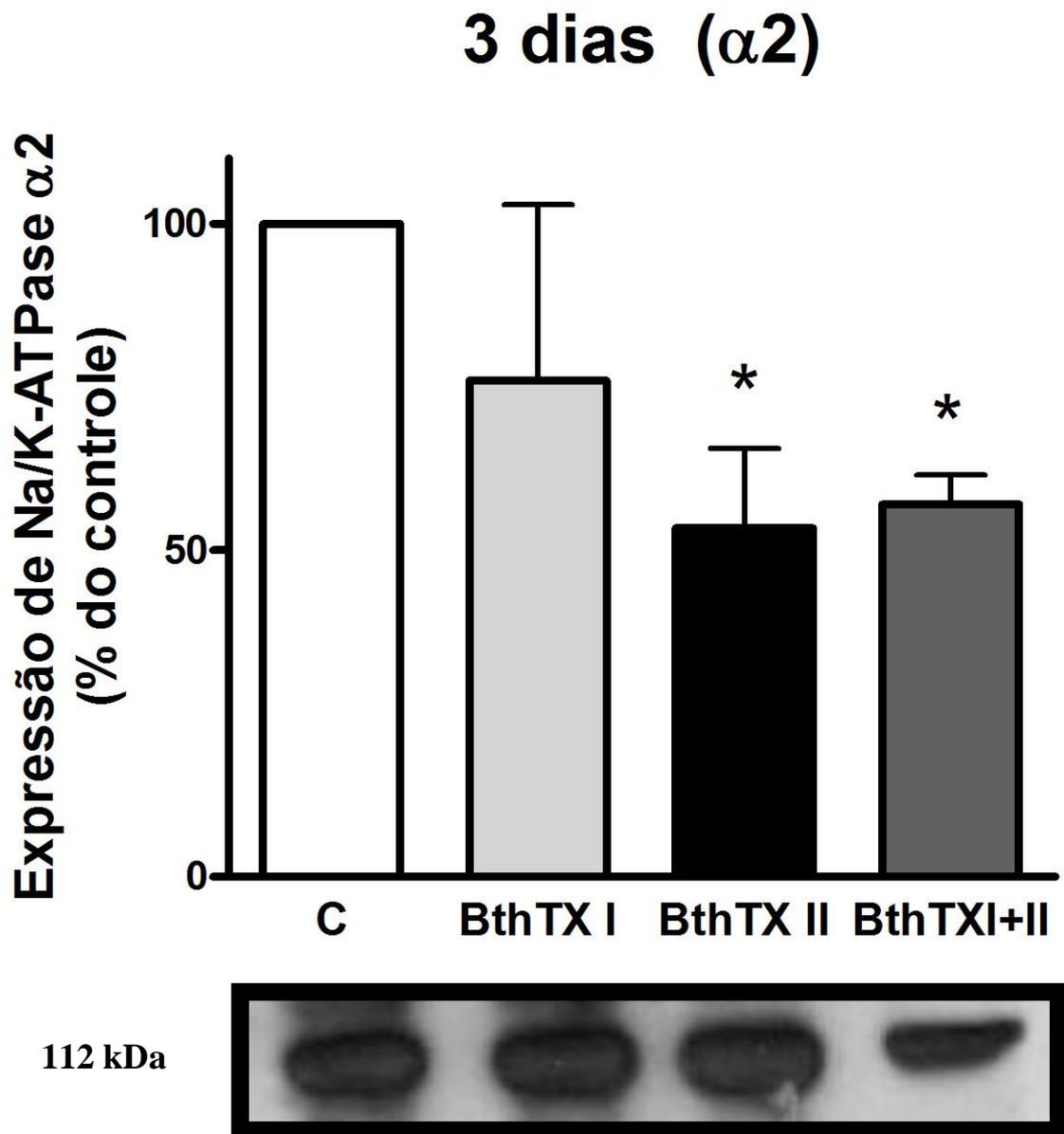
A isoforma  $\alpha 1$  da  $Na^+/K^+$ -ATPase é minoritária em músculo no EDL (cerca de 10-15%, He *et al.*, 2001), porém é chamada de isoforma *housekeeping* por ser encontrada em praticamente todas as células de mamíferos, incluindo células inflamatórias. O trabalho de Schaffazick e colaboradores (2010) mostrou que o veneno bruto promove um aumento significativo na expressão dessa isoforma no período de 1 e 3 dias após sua injeção, também considerado como uma tentativa de compensação iônica e particularmente uma possível influência da presença de células inflamatórias. Os resultados mostrados nas figuras 25 (1 dia pós-injeção) e 26 (3 dias pós-injeção) indicam que não parece haver modificação significativa na expressão da isoforma  $\alpha 1$  da  $Na^+/K^+$ -ATPase, o que sugere uma menor participação do processo inflamatório na lesão induzida pelas miotoxinas quando comparada com as produzidas pelo veneno bruto.

#### **4.6 Efeito das miotoxinas BthTX I e/ou BthTX II na atividade $Na^+/K^+$ -ATPásica *in vitro***

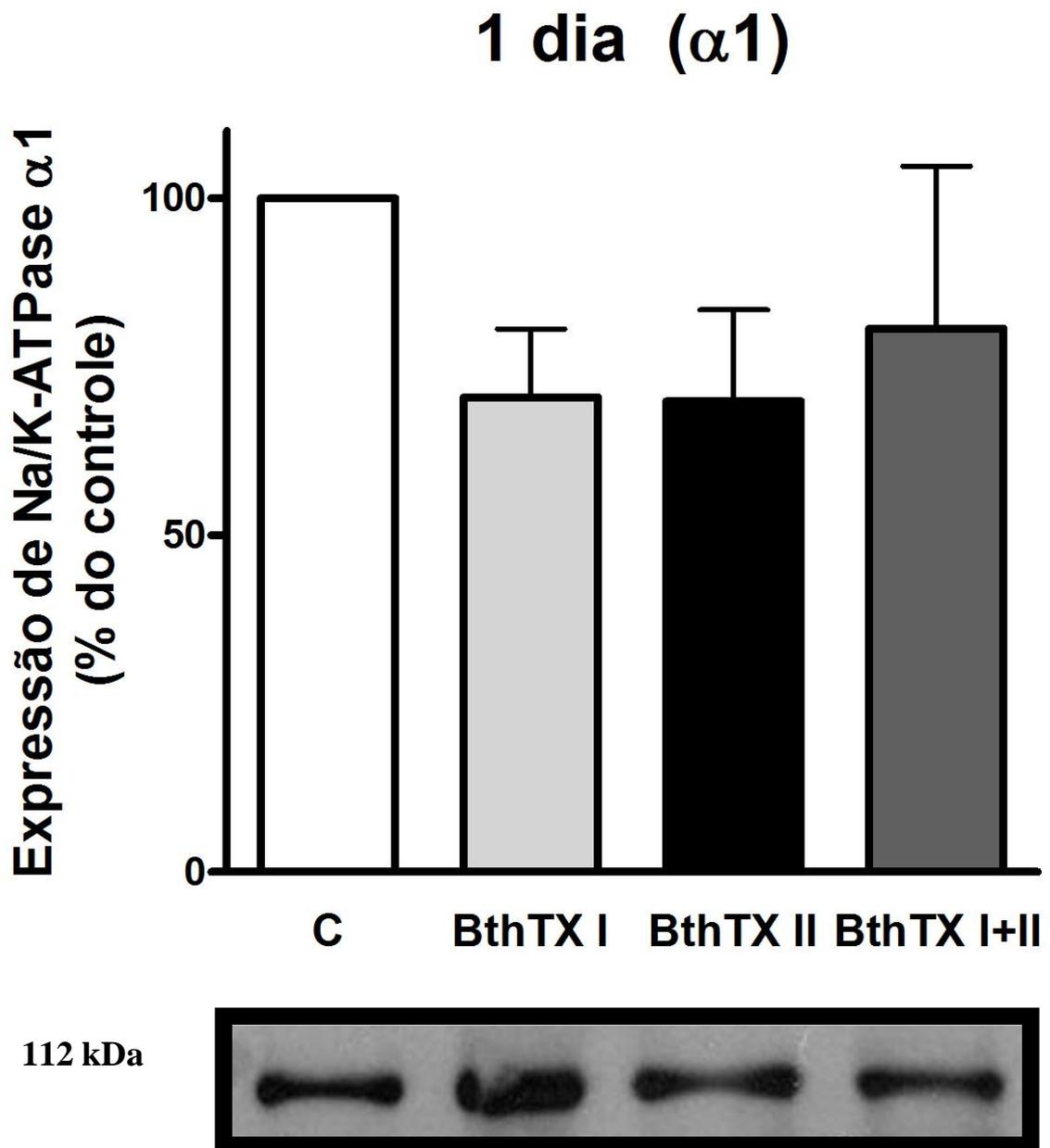
Utilizando duas preparações diferentes, uma enriquecida na isoforma  $\alpha 1$  (tecido renal de ratos) e outra em  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$  (hemisfério cerebral de ratos), medimos a capacidade das toxinas em inibir a atividade enzimática *in vitro*, dessa vez avaliando a  $Na^+/K^+$ -ATPase como um possível alvo direto das miotoxinas. Nesse panorama, é importante destacar que os resultados obtidos com o veneno bruto nas mesmas preparações e também em EDL de ratos mostraram que não ocorrem modificações na atividade  $Na^+/K^+$ -ATPásica (Schaffazick *et al.*, 2010). Os experimentos ora realizados em tecido renal de rato (figura 27A) mostram que mesmo altas concentrações das miotoxinas (40  $\mu g/ml$ ) não foram capazes de inibir a atividade  $Na^+/K^+$ -ATPásica e, ao contrário, promoveram um aumento significativo na atividade enzimática em relação ao controle, como foi o caso de BthTX I isolada. Em relação aos hemisférios cerebrais de rato (figura 27B), as miotoxinas não foram capazes nem de inibir nem de estimular a atividade  $Na^+/K^+$ -ATPásica.



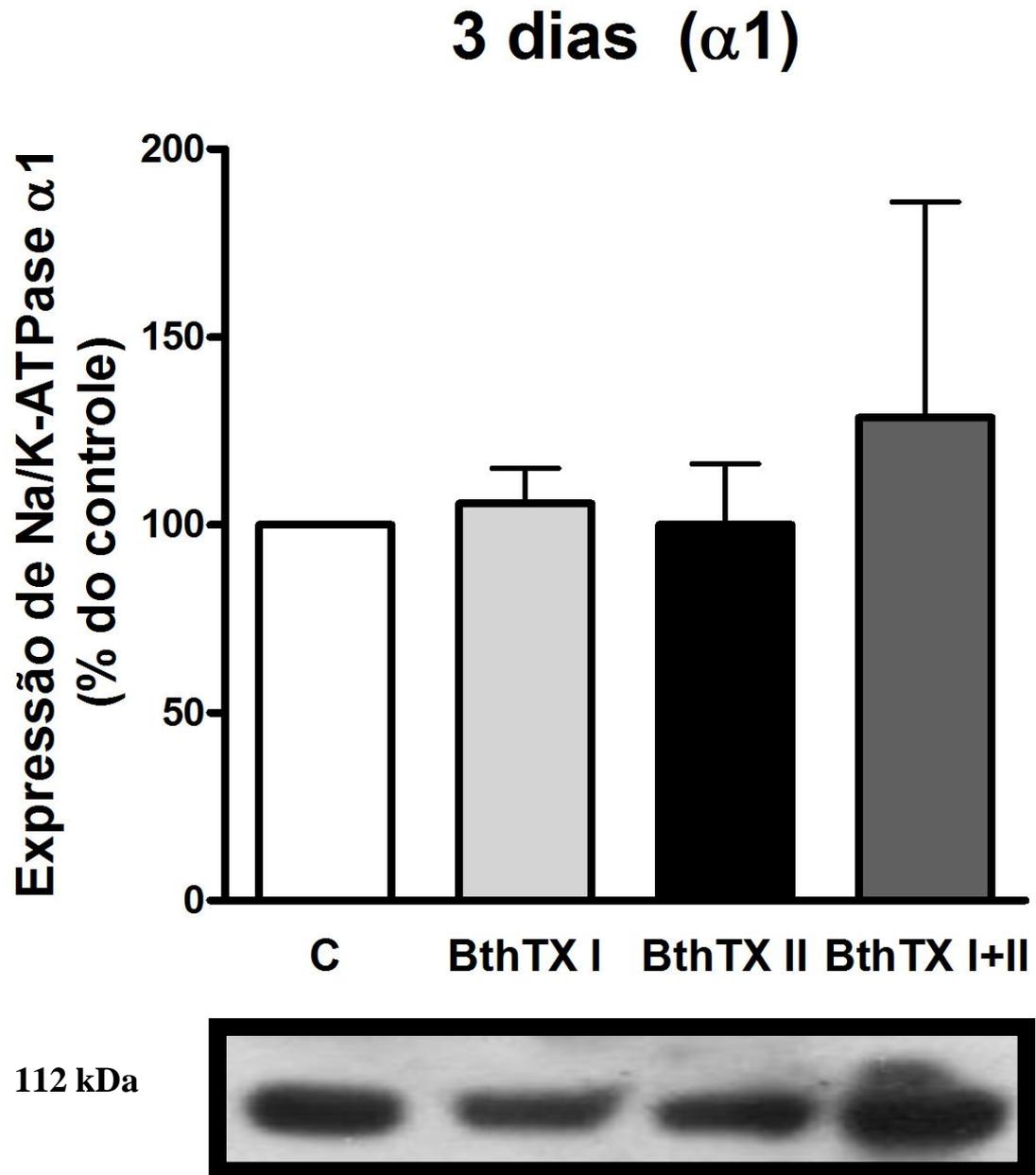
**Figura 23. Expressão da isoforma  $\alpha 2$  da Na/K-ATPase 1 dia após a indução de mionecrose pelas miotoxinas BthTX I (1  $\mu\text{g/g}$ ), BthTX II (1  $\mu\text{g/g}$ ) e BthTX I+II (1  $\mu\text{g/g}$  de cada). O Western blot típico mostra as bandas específicas imunomarcadas, após adição do anticorpo primário (mouse anti- $\alpha 2$  da Na/K-ATPase, dil. 1:1000) e do anticorpo secundário (anti-mouse, dil. 1:2000). O gráfico apresenta a quantificação por análise densitométrica da expressão da isoforma  $\alpha 2$  da Na/K-ATPase. Os valores são a média  $\pm$  EPM de 3-6 amostras independentes. C = grupo controle. One-way Anova seguido de pós-teste de Tukey.\*  $P < 0,05$  em relação a C (controle)**



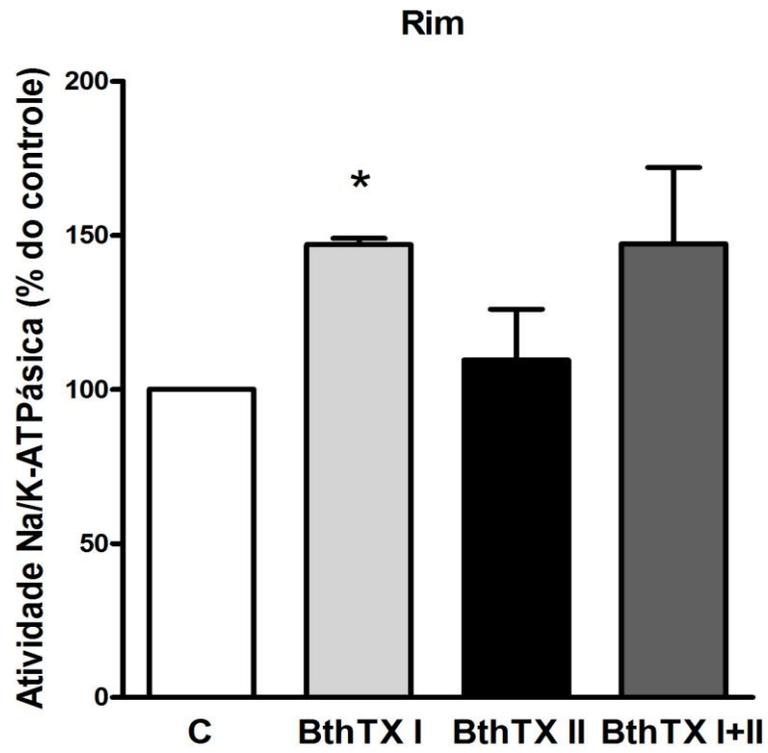
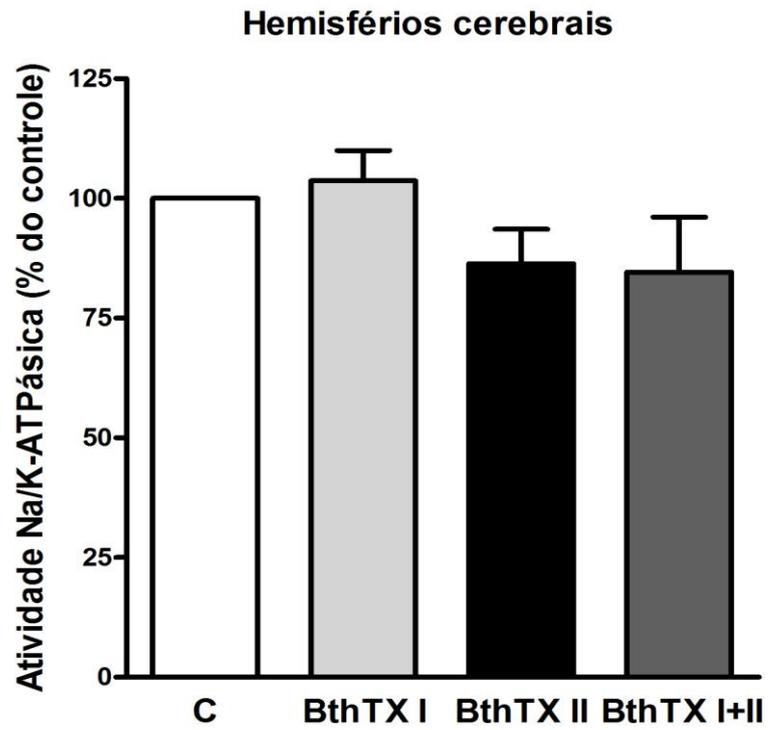
**Figura 24.** Expressão da isoforma  $\alpha 2$  da Na/K-ATPase 3 dias após a indução de mionecrose pelas miotoxinas BthTX I (1  $\mu\text{g/g}$ ), BthTX II (1  $\mu\text{g/g}$ ) e BthTX I+II (1  $\mu\text{g/g}$  de cada). O Western blot típico mostra as bandas específicas imunomarcadas, após adição do anticorpo primário (mouse anti- $\alpha 2$  da Na/K-ATPase, dil. 1:1000) e do anticorpo secundário (anti-mouse, dil. 1:2000). O gráfico apresenta a quantificação por análise densitométrica da expressão da isoforma  $\alpha 2$  da Na/K-ATPase. Os valores são a média  $\pm$  EPM de 3-6 amostras independentes. C = grupo controle. One-way Anova seguido de pós-teste de Tukey.\*  $P < 0,05$  em relação a C (controle).



**Figura 25.** Expressão da isoforma  $\alpha 1$  da Na/K-ATPase 1 dia após a indução de mionecrose pelas miotoxinas BthTX I (1  $\mu\text{g/g}$ ), BthTX II (1  $\mu\text{g/g}$ ) e BthTX I+II (1  $\mu\text{g/g}$  de cada). O Western blot típico mostra as bandas específicas imunomarcadas, após adição do anticorpo primário (mouse anti- $\alpha 1$  da Na/K-ATPase, dil. 1:1000) e do anticorpo secundário (anti-mouse, dil. 1:2000). O gráfico apresenta a quantificação por análise densitométrica da expressão da isoforma  $\alpha 1$  da Na/K-ATPase. Os valores são a média  $\pm$  EPM de 4-8 amostras independentes. C = grupo controle.



**Figura 26.** Expressão da isoforma  $\alpha 1$  da Na/K-ATPase 3 dias após a indução de mionecrose pelas miotoxinas BthTX I (1  $\mu\text{g/g}$ ), BthTX II (1  $\mu\text{g/g}$ ) e BthTX I+II (1  $\mu\text{g/g}$  de cada). O Western blot típico mostra as bandas específicas imunomarcadas, após adição do anticorpo primário (mouse anti- $\alpha 1$  da Na/K-ATPase, dil. 1:1000) e do anticorpo secundário (anti-mouse, dil. 1:2000). O gráfico apresenta a quantificação por análise densitométrica da expressão da isoforma  $\alpha 1$  da Na/K-ATPase. Os valores são a média  $\pm$  EPM de 4-7 amostras independentes. C = grupo controle.

**A****B**

**Figura 27. Efeito de BthTX I, BthTX II e BthTX I+II (40 µg/ml) sobre a atividade Na/K-ATPásica em preparações de rim (A) e hemisférios cerebrais (B) de rato *in vitro*.** Os valores são média ± EPM de 3 experimentos independentes. Teste t de Student. \*P<0,05 em relação ao C (grupo controle).

## 5. DISCUSSÃO

O veneno de *B. jararacussu*, quando administrado pela via perimuscular na pata posterior de camundongos para que banhe externamente o músculo esquelético EDL (rico em fibras glicolíticas rápidas do tipo II), produz uma rápida resposta miotóxica (Calil-Elias *et al.*, 2002a,b). Através da análise bioquímica da enzima sarcoplasmática creatina cinase (CK) liberada e presente no plasma sanguíneo e do exame histológico, a avaliação do processo miodegenerativo *in vivo* revela que ele se inicia nas primeiras horas após a injeção e apresenta seu pico em 3 dias, quando praticamente não há mais células musculares íntegras, havendo completa regeneração após 7 dias (Calil-Elias *et al.*, 2002a,b). Nessas condições, mostramos que ATPases diretamente envolvidas no controle das concentrações intracelulares do íon  $\text{Ca}^{2+}$  e no potencial de membrana, funções associadas à manutenção da excitabilidade e contração/relaxamento muscular, são afetadas (Schaffazick *et al.*, 2010). Deste modo, observamos uma redução da expressão de SERCA1 e da atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica total, e um aumento da expressão de SERCA2 e da isoforma  $\alpha 1$  da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, com perfil semelhante adotado pela isoforma  $\alpha 2$ . *In vitro*, o veneno foi capaz de inibir a atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica, mas não  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPásica, com um  $\text{IC}_{50} < 1 \mu\text{g/ml}$ . Como as miotoxinas BthTX I e BthTX II são consideradas principais responsáveis pelo efeito degenerativo, investigamos o efeito destas sobre as ATPases do tipo P do EDL.

O conjunto de resultados obtidos neste trabalho através de Western Blotting para a expressão das isoformas da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, revelou que as miotoxinas BthTX I e BthTX II isoladas ou associadas não foram capazes de produzir alterações significativas em SERCA1 e SERCA2 durante o período crítico de miodegeneração no EDL de camundongos, corroborando com a ausência de variação da atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica total no 3º dia pós-injeção (embora pareça ocorrer modificação no 1º dia, discutido posteriormente), divergindo dos dados obtidos por Schaffazick e cols (2010) para o veneno bruto usado na mesma dose (1 µg/g), uma mistura complexa de enzimas e pequenos peptídeos que possui uma ação lesiva muito mais intensa. Por outro lado, os dados da expressão das isoformas da subunidade  $\alpha$  da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase mostraram que há diminuição significativa de  $\alpha 2$ , isoforma predominante no músculo esquelético, sem alteração de  $\alpha 1$ . Apesar desses resultados serem diferentes do

obtido com o veneno bruto (Schaffazick *et al.*, 2010), eles indicam que BthTX II, ou ela associada a BthTX I, pode afetar o sarcolema.

Dentre as espécies do gênero *Bothrops*, o veneno de *B. jararacussu* é o que contém a maior quantidade de miotoxinas, chegando a cerca de 15-25% do conteúdo proteico total (Homs-Brandeburgo *et al.*, 1988; Moura-da-Silva *et al.*, 1991). Vários trabalhos mostram que as miotoxinas produzem degeneração muscular similar ao do veneno bruto, entretanto as toxinas isoladas são menos potentes *in vitro* no que se refere à liberação de CK (Melo *et al.*, 1993; Oshima-Franco *et al.*, 2000). *In vivo*, os dados revelam, em sua maioria, equipotência (Melo *et al.*, 1993; Ticli *et al.*, 2005; Veronese *et al.*, 2005; Rostelato-Ferreira *et al.*, 2010; de Alvarenga *et al.*, 2011), embora uma menor potência também tenha sido reportada, em especial para BthTX I (Borges *et al.*, 2000; Andrião-Escarso *et al.*, 2000; Biondo *et al.*, 2003). De todo modo, o processo de regeneração é mais bem sucedido com as miotoxinas, provavelmente por estas manterem intactos vasos sanguíneos, nervos e a lâmina basal, o que não acontece com o veneno, o qual possui atividade hemorrágica e proteolítica gerando mionecrose (Gutierrez *et al.*, 1991; Gutierrez & Lomonte, 1995; Oshima-Franco *et al.*, 2000). Esse perfil parece explicar, pelo menos em parte, as alterações mais brandas com relação à expressão e atividade enzimática das ATPases.

Não há descrição até o momento de qual sítio de ligação é responsável pela interação entre as miotoxinas e o miócito, contudo existem evidências que indicam que o sítio de ação primário localiza-se no sarcolema (Gutiérrez & Ownby, 2003; Montecucco *et al.*, 2008). Após interação, ocorre desorganização membranar e/ou degradação fosfolipídica, dependendo da existência de atividade fosfolipásica, que afetam a integridade do sarcolema com efluxo de enzimas citosólicas e influxo de íons como o  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$  (Gutiérrez & Ownby, 2003; Montecucco *et al.*, 2008). A sobrecarga citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$ , principalmente, promove uma série de eventos que podem resultar em morte celular como a ativação de proteinases, endonucleotidasas e fosfolipases  $\text{Ca}^{2+}$ -dependentes, além de aumento de volume mitocondrial e dissipação do potencial eletroquímico (Zhivotovsky & Orrenius, 2011), etapas estas que são comuns a diferentes tipos de injúria muscular como o processo de isquemia-reperfusão (Siqueira-Batista *et al.*, 1994). Mostramos que a expressão da isoforma  $\alpha 2$  da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase é reduzida pela BthTX II, o que está de acordo com o maior dano da membrana plasmática pela miotoxinas, em especial aquelas que possuem atividade fosfolipásica. A expressão da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase está associada com o processo de morte celular. Assim, estudos mostraram

que a redução dos níveis de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase da membrana plasmática resulta em despolarização, perda de  $\text{K}^+$  intracelular e disparo de apoptose (Mann *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2003). É interessante notar que a inibição da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase com ouabaína potencializa o efeito miotóxico do veneno de *B. jararacussu* (Tomaz *et al.*, 2008). Entretanto, a inexistência de alteração significativa da expressão de SERCA sugere que o processo degenerativo foi incompleto, reforçando o conceito de que o veneno possui outros componentes que intensificam a miotoxicidade.

A reação inflamatória é um elemento presente após o acidente ofídico e é reproduzido experimentalmente (Barbosa *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2009; Patrão-Neto *et al.*, 2013). O recrutamento de leucócitos, especialmente neutrófilos, surge algumas horas depois da lesão muscular direta, sendo seguidos por macrófagos, que se tornam predominantes em 2-3 dias pós-lesão (Teixeira *et al.*, 2003a, 2009). A capacidade das células inflamatórias liberarem espécies reativas indica que tenham um importante papel no efeito miotóxico de venenos de *Bothrops spp.* (Zamunér *et al.*, 2001), podendo ser pelo menos em parte responsáveis pela miodegradação fibrilar (Gutierrez *et al.*, 1986). Além disso, o pico de citocinas coincide com o fenômeno de necrose muscular (Barros *et al.*, 1998). De fato, a utilização de anti-inflamatórios esteroidais reduz a miotoxicidade do veneno de *B. jararacussu* (Patrão-Neto *et al.*, 2013) e prejudica a recuperação muscular (Vomero *et al.*, 2009). Para o veneno de *Bothrops jararaca*, a inibição de miotoxinas  $\text{PLA}_2$  não afeta o processo inflamatório, ao contrário do que acontece com as metaloproteinases (Zychar *et al.*, 2010) como a jararhagina, que apresenta perfil pró-inflamatório *in vivo* e *in vitro* (Gallagher *et al.*, 2005). Por outro lado, alguns estudos mostram que a neutropenia não afeta a fase degenerativa, mas é importante para a regeneração muscular (Teixeira *et al.*, 2003b, 2005). Ademais, a inibição de alguns fatores pró-inflamatórios não reduzem a capacidade miotóxica do veneno de *B. asper* (Chaves *et al.*, 2005, 2006). Entretanto, isto pode ser devido a dependência do *background* genético do animal envenenado (Carneiro *et al.*, 2002) e do tipo muscular (Tomaz *et al.*, 2008).

BthTX I e II induzem a migração leucocitária *in vivo*, sendo que BthTX II parece mais potente nesse aspecto (de Castro *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2009), assim como o efeito edematogênico (Pereira *et al.*, 2009). A atividade  $\text{PLA}_2$  não exerce qualquer influência na migração (de Castro *et al.*, 2000). Os achados com o veneno bruto revelaram um aumento significativo da expressão da isoforma  $\alpha 1$  da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase em 1 e 3 dias pós-injeção (Schaffazick *et al.*, 2010), o que foi considerado resultante da infiltração de células

inflamatórias que exibem quase unicamente essa isoforma (Levenson, 1994). Com BthTX II, isolada ou associada à BthTX I, não observamos mudança do perfil de  $\alpha 1$  apesar da queda de  $\alpha 2$ , o que parece indicar que há efeito miotóxico com infiltração inflamatória, mascarando a queda de expressão de  $\alpha 1$  muscular. Visto que não houve aumento dos níveis de  $\alpha 1$ , pode-se supor que o processo inflamatório é menos intenso que o causado pelo veneno.

A atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica do EDL 3 dias após a injeção seguiu o que foi observado para a expressão de SERCA, ou seja, não houve diferença em relação ao controle. Por outro lado, apesar de ainda inconclusivo, os resultados de 1 dia pós-injeção indicam que há efeitos opostos das miotoxinas. Enquanto que BthTX I parece estimular a atividade do EDL *in vivo*, BthTX II (ou associada a BthTX I) reduz a mesma. BthTX II tem a capacidade de hidrolisar membranas biológicas e sabe-se que a restrição do conteúdo de fosfolipídios inibe a atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica de SERCA (Pikula *et al.*, 1994). A análise da resposta à BthTX I revela-se mais complexa, porém pode apontar alterações na expressão/atividade de proteínas reguladoras da função da SERCA em músculo esquelético, como por exemplo a sarcolipina (Tupling *et al.*, 2011). Ademais, é importante considerar que BthTX I e II podem afetar a mitocôndria *in vivo* e em função disso promover uma diminuição na síntese de ATP, comprometendo a atividade das bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  (Montecucco *et al.*, 2008)

Um dos principais achados desse trabalho vem da avaliação do efeito das miotoxinas sobre a atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase *in vitro*. Apenas BthTX II, e não a BthTX I, foi capaz de inibir a atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica de EDL de rato de modo concentração-dependente. A análise visual dos resultados mostra que o  $\text{CI}_{50}$  está em torno de 0,1  $\mu\text{g/ml}$ , cerca de 10 vezes menor que o veneno bruto (Schaffazick *et al.*, 2010). Foi demonstrado anteriormente que a miotoxina *a* (massa molecular = 4,6 kDa) de *Crotalus viridis viridis*, também da família *Viperidae*, interage de forma específica com a SERCA apresentando um Kd estimado indiretamente de 1  $\mu\text{g/ml}$ , ou 200 nM (Volpe *et al.*, 1986; Utaisincharoen *et al.*, 1991). A porção C-terminal da miotoxina *a* é a responsável pela inibição, altamente básica com vários resíduos Lisina (Baker *et al.*, 1992), possuindo um Kd de 20  $\mu\text{M}$  para captação de  $\text{Ca}^{2+}$  (Baker *et al.*, 1995). Um valor similar foi observado para o  $\text{CI}_{50}$  da miotoxina I de *B. asper* (massa molecular = 10,7 kDa) referente a inibição da atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica, em torno de 4,7  $\mu\text{g/ml}$ , ou 450 nM (Gutiérrez *et al.*, 1987). Entretanto, neste caso os autores propõem que a ação seja sobre os fosfolipídios da membrana reticular (Gutiérrez *et al.*, 1987). Em nosso trabalho, o  $\text{CI}_{50}$  estimado para a inibição da atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica está ao redor de 6 nM,

ou seja, mais potente que as outras miotoxinas descritas anteriormente. Não há como descartar que a inibição seja por interação inespecífica sobre a membrana na qual a ATPase está inserida, entretanto consideramos essa possibilidade remota porque: (1) geralmente nessa situação a potência inibitória é baixa (Gutiérrez *et al.*, 1987); (2) BthTX I, que também afeta a integridade membranar, não inibe a atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica; (3) tanto BthTX I quanto BthTX II não inibem a atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPásica, mesmo em concentrações bem maiores. Ao contrário, houve aumento da atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPásica renal, apenas por BthTX I. É interessante notar que esse aumento já foi visto em rins de ratos após injeção de veneno de *B. alternatus* (Linardi *et al.*, 2011).

Cintra-Francischinelli e colaboradores (2009) mostrou em mioblastos C2C12 que há um sinergismo entre a miotoxinas Lys49 e Asp49 na indução de mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  de estoques intracelulares. Apesar da variabilidade biológica na composição de venenos, Homs-Brandeburgo e colaboradores (1988) mostraram que a proporção BthTX I (fração  $\text{S}_{\text{III-SPV}}$ ):BthTX II (fração  $\text{S}_{\text{III-SPIV}}$ ) seria de 2:1. Nesse contexto, utilizamos essa mesma proporção para o ensaio de inibição da atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica e não foi observado qualquer efeito adicional. É interessante que quando comparamos o  $\text{IC}_{50}$  de BthTX II ( $\sim 0,1 \mu\text{g/ml}$ ) com o do veneno bruto ( $\sim 1 \mu\text{g/ml}$ ; Schaffazick *et al.*, 2010), verificamos que há uma diferença de cerca de 10 vezes, compatível com a proporção desta miotoxina no veneno (Homs-Brandeburgo *et al.*, 1988; Moura-da-Silva *et al.*, 1991). Assim, conclui-se que BthTX II é a principal miotoxina responsável pela inibição da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, e possivelmente a única.

## 6. CONCLUSÕES

- As miotoxinas do veneno de *Bothrops jararacussu* bothropstoxina I e bothropstoxina II, isoladas ou associadas, não mimetizam o efeito do veneno bruto sobre a atividade e expressão proteica das isoformas da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de reticulo sarcoplasmático (SERCA) e da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase do músculo esquelético de contração rápida EDL, transportadores estes importantes para a homeostasia intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ ;
- A bothropstoxina II é um potente inibidor da atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica *in vitro*, enquanto que a bothropstoxina I não apresenta qualquer efeito.

## 7. REFERÊNCIAS

Ambrosio ALB, Nonato MC, de Araújo HSS, Arni R, Ward RJ, Ownby CL, de Souza DHF, Garratt RC. A molecular mechanism for Lys49-phospholipase A<sub>2</sub> activity based on ligand-induced conformational change. *J Biol Chem* 280: 7326-35, 2005.

Andrião-Escarso SH, Soares AM, Rodrigues VM, Angulo Y, Díaz C, Lomonte B, Gutiérrez JM, Giglio JR. Myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> in *Bothrops* snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. *Biochimie* 82:755-63, 2000.

Baker B, Utaisincharoen P, Tu AT. Structure-function relationship of myotoxin a using peptide fragments. *Arch Biochem Biophys* 298:325-31, 1992.

Baker KJ, East JM, Lee AG. Mechanism of inhibition of Ca<sup>2+</sup>-ATPase by myotoxin a. *Biochem J* 307:571-9, 1995.

Barbosa AM, Villaverde AB, Guimarães-Souza L, Ribeiro W, Cogo JC, Zamuner SR. Effect of low-level laser therapy in the inflammatory response induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon* 51:1236-44, 2008.

Barreto F, Rezende DC, Scaramello CB, Silva CL, Cunha VMN, Caricati-Neto A, Jurkiewicz A, Noël F, Quintas LEM. Lack of evidence for regulation of cardiac P-type ATPases and MAP kinases in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of constitutively active  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors. *Braz J Med Biol Res* 43:500-5, 2010.

Barros SF, Friedlanskaia I, Petricevich VL, Kipnis TL. Local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with *Bothrops atrox* venom. *Mediat Inflamm* 7: 339-46, 1998.

Baylor SM, Hollingworth S. Intracellular calcium movements during excitation–contraction coupling in mammalian slow-twitch and fast-twitch muscle fibers. *J. Gen Physiol* 139:261-72, 2012.

Berchtold MW, Brinkmeier H, Müntener M. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol Rev* 80:1215-65, 2000.

Berridge M, Lipp P, Bootman M. Calcium signaling. *Curr Biol* 9:157-9, 1999.

Berridge M, Lipp P, Bootman M. The versatility and universality of calcium signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:11-21, 2000.

Biondo R, Pereira AM, Marcussi S, Pereira PS, França SC, Soares AM. Inhibition of enzymatic and pharmacological activities of some snake venoms and toxins by *Mandevilla velutina* (*Apocynaceae*) aqueous extract. *Biochimie* 85:1017-25, 2003.

Bjarnason JB, Fox JW. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacol Ther* 62:325-72, 1994.

Blanco G, Mercer RW. Isoenzymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol* 275: F633-650, 1998.

Bootman MD, Berridge MJ. The elemental principles of calcium signaling. *Cell* 83: 675-8, 1995.

Bonfim VL, de Carvalho DD, Ponce-Soto LA, Kassab BH, Marangoni S. Toxicity of phospholipases A<sub>2</sub> D49 (6-1 and 6-2) and K49 (Bj-VII) from *Bothrops jararacussu* venom. *Cell Biol Toxicol* 25:523-32, 2009.

Borges MH, Soares AM, Rodrigues VM, Andrião-Escarso SH, Diniz H, Hamaguchi A, Quintero A, Lizano S, Gutiérrez JM, Giglio JR, Homsí-Brandeburgo MI. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (*Flacourtiaceae*) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A<sub>2</sub>. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 127:21-30, 2000.

Brini M, Carafoli E. Calcium pumps in health and disease. *Physiol Rev* 89:1341-78, 2009.

Caccin P, Pellegatti P, Fernandez J, Vono M, Cintra-Francischinelli M, Lomonte B, Gutiérrez JM, Di Virgilio F, Montecucco C. Why myotoxin-containing snake venoms possess powerful nucleotidases? *Biochem Biophys Res Commun* 430:1289-93, 2013.

Calil-Elias S, Martinez AM, Melo PA. Effect of heparin and antivenom on skeletal muscle damage produced by *Bothrops jararacussu* venom. *Histol Histopathol.* 17:463-70, 2002a.

Calil-Elias S, Thattassery E, Martinez AM, Melo PA. Effect of perimuscular injection of *Bothrops jararacussu* venom on plasma creatine kinase levels in mice: influence of dose and volume. *Braz J Med Biol Res* 35:1233-5, 2002b.

Calvo S, Vullhorst D, Venepally P, Cheng J, Karavanova I, Buonanno A. Molecular dissection of DNA sequences and factors involved in slow muscle-specific transcription. *Mol Cell Biol* 21:8490-503, 2001.

Carneiro AS, Ribeiro OG, De Franco M, Cabrera WH, Vorraro F, Siqueira M, Ibañez OM, Starobinas N. Local inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* venom differs in mice selected for acute inflammatory response. *Toxicon.* 40:1571-9, 2002.

Castro P, Nasser H, Abrahão A, Reis LC, Riça I, Valença SS, Rezende DC, Quintas LEM, Cavalcante MCM, Porto LC, Koatz VLG. Aspirin and indomethacin reduce lung inflammation of mice exposed to cigarette smoke. *Biochem Pharmacol* 77:1029-39, 2009.

Carafoli E. Calcium pump of the plasma membrane. *Physiol. Rev* 7:129-53, 1991.

Carafoli E, Guerini D. Molecular and cellular biology of plasma membrane calcium ATPase. *Trends Cardiovasc Med* 3:177-84, 1993.

Chin D, Means AR. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Cell Biol* 10:322-8, 2000.

Chaves F, Teixeira CF, Gutiérrez JM. Role of nitric oxide in the local and systemic pathophysiological effects induced by *Bothrops asper* snake venom in mice. *Inflamm Res* 55:245-53, 2006.

Chaves F, Teixeira CF, Gutiérrez JM. Role of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 in the local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom: an experimental assessment in mice. *Toxicon* 45:171-8, 2005.

Cintra-Francischinelli M, Pizzo P, Rodrigues-Simioni L, Poce-Soto LA, Rosetto O, Lomonte B, Gutiérrez JM, Pozzan T, Montecucco C. Calcium imaging of muscle cells treated with snake myotoxins reveals toxin synergism and presence of acceptors. *Cell Mol Life Sci* 6:1718-28, 2009.

Da Silva MVN, Arruda EZ, Murakami YLB, Moraes RAM, EKik CZ, Tomaz MA, Fernandes FFA, Oiveira CZ, Soares AM, Giglio JR, Melo PA. Evaluation of three Brazilian antivenom ability to antagonize myonecrosis and hemorrhage induced by *Bothrops* snake venoms in a mouse model. *Toxicon* 50:196-205, 2007.

De Alvarenga ES, Silva SA, Barosa LC, Demuner AJ, Parreira AG, Ribeiro RI, Marcussi S, Ferreira JM, Resende RR, Granjeiro PA, Silva JA, Soares AM, Marangoni S, Da Silva SL. Synthesis and evaluation of sesquiterpene lactone inhibitors of phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops jararacussu*. *Toxicon* 57:100-8, 2011.

De Castro RC, Landucci EC, Toyama MH, Giglio JR, Marangoni S, De Nucci G, Antunes E. Leucocyte recruitment induced by type II phospholipases A<sub>2</sub> into the rat pleural cavity. *Toxicon* 38:1773-85, 2000.

De Luca A, Liantonio A, Pierno S, Desaphy JF, Conte Camerino D. Potential targets for skeletal muscle impairment by hypogravity: basic characterization of resting ionic conductances and mechanical threshold of rat fast and slow-twitch muscle fibers. *J Gravit Physiol* 5:75-6, 1998.

Fuchs A. Control of Movement. In: Textbook of Physiology – Excitable Cells and Neurophysiology; Patton, Fuchs, Hille, Scher, Steiner W.B. Saunders International Edition; 21<sup>a</sup> Ed; 1989.

Gallager P, Bao Y, Serrano SMT, Laing D, Theakston RDG, Gutiérrez JM, Escalante T, Zigrino P, Moura-da-Silva AM, Nischt R, Mauch C, Moskaluk C, Fox JW. Role of the snake venom toxin jararhagin in proinflammatory pathogenesis: *In vitro* and *in vivo* gene expression analysis of the effects of the toxin. *Arch Biochem Biophys* 441:1-15, 2005.

Gutiérrez JM, Chaves F, Cerdas L. Inflammatory infiltrate in skeletal muscle injected with *Bothrops asper* venom. *Rev Biol Trop* 34:209-14, 1986.

Gutiérrez JM, Lomonte B, León G, Rucavado A, Chaves F, Angulo Y. Trends in snakebite envenomation therapy: Scientific, technological and public health considerations. *Curr Pharmac* 13:2935-50, 2007.

Gutiérrez JM, Ownby JM. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A<sub>2</sub>: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon*, 42:915-31, 2003.

Gutiérrez JM, Rojas G, Lomonte B, Gené JA, Cerdas L. Effects of a myotoxic phospholipase A<sub>2</sub> isolated from *Bothrops asper* venom on skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Toxicon* 25:1244-8, 1987.

Gutiérrez JM, Rucavado A, Escalante T, Díaz C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon* 45:997-1011, 2005.

Harris JB. Myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> and the regeneration of skeletal muscles. *Toxicon* 42:933-45, 2003.

He S, Shelly DA, Moseley AE, James PF, James JH, Paul RJ, Lingrel JB. The  $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ -isoforms of Na-K-ATPase play different roles in skeletal muscle contractility. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281:R917-25, 2001.

Homsí-Brandeburgo MI, Giglio JR, Queiroz LS, Santo-Neto H, Rodríguez-Simioni L. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. *Toxicon* 26:615-27, 1988.

Jorge MT, Ribeiro LA. Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. *Rev Assoc Med Bras* 36:66-7, 1990.

Kaneko M, Matsumoto Y, Hayashi H, Kobayashi A, Yamazaki N. Oxygen free radicals and calcium homeostasis in the heart. *Mol Cell Biochem* 139:91-100, 1994.

Kawano J, Anai K, Sugiki M, Yoshida E, Maruyama M. Vascular endothelial cell injury induced by *Bothrops jararaca* venom; non-significance of hemorrhagic metalloproteinase. *Toxicon* 40:1553-62, 2002.

Koss KL, Kranias EG. Phospholamban: a prominent regulator of myocardial contractility. *Circ Res* 79:1059-63, 1996.

Kühlbrandt W. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:282-95, 2004.

Levenson R. Isoforms of the Na,K-ATPase: family members in search of function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 123:1-45, 1994.

Linardi A, Rocha e Silva TAA, Myabara EH, Franco-Penteado CF, Cardoso KC, Boer PA, Moriscot AS, Gontijo JAR, Joazeiro PP, Collares-Buzato CB, Hyslop S. Histological and functional renal alterations caused by *Bothrops alternatus* snake venom: Expression and activity of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1810:895-906, 2011.

Lopes MCF, Vale MGP, Carvalho AP. Ca<sup>2+</sup> dependent binding of tamoxifen to calmodulin isolated from bovine brain. *Cancer Res* 50:2753-8, 1990.

Lytton J, Westlin M, Burk SE, Shull GE, MacLennan DH. Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *J Biol Chem* 267:14483-9, 1992.

Mann CL, Bortner CD, Jewell CM, Cidlowski JA. Glucocorticoid-induced plasma membrane depolarization during thymocyte apoptosis: association with cell shrinkage and degradation of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-adenosine triphosphatase. *Endocrinology* 142:5059-68, 2001.

Marín J, Encabo A, Briones A, Garcia-Cohen EC, Alonso MJ. Mechanisms involved in the cellular calcium homeostasis in vascular smooth muscle: calcium pumps. *Life Sci* 64:279-303, 1999.

Martonosi AN, Slawomir Pikula S. The network of calcium regulation in muscle. *Acta Biochim Pol* 50:1-30, 2003.

Mauger JP, Poggioli J, Claret M. Synergistic stimulation of the Ca<sup>2+</sup> influx in rat hepatocytes by glucagon and the Ca<sup>2+</sup>- linked hormones vasopressin and angiotensin II. *J Biol Chem* 260:11635-42, 1985.

Mebis D, Ownby CL. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. *Pharmacol Ther* 48:223-36, 1990.

Melo PA, Homsí-Brandeburgo MI, Giglio JR, Suarez-Kurtz G. Antagonism of the myotoxic effects of *Bothrops jararacussu* venom and bothrotoxin by polyanions. *Toxicon* 31:285-91, 1993.

Melo PA, Ownby CL. Different sensitivity of fast and slow-twitch muscles to some venoms and myotoxins. *Toxicon* 37:199-215, 1999.

Mendler L, Szakonyi G, Zádor E, Görbe A, Dux L, Wuytack F. Expression of sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPases in the rat extensor digitorum longus (EDL) muscle regenerating from notexin-induced necrosis. *J Muscle Res Cell Motil* 19:777-85, 1998.

Menegali BT, Nesi RT, Souza PS, Silva LA, Silveira PC, Valença SS, Pinho RA. The effects of physical exercise on the cigarette smoke-induced pulmonary oxidative response. *Pulm Pharmacol Ther* 22:567-73, 2009.

Milani RJ, Jorge MT, De Campos FP, Martins FP, Bousso A, Cardoso JL, Ribeiro LA, Fan HW, Franca FO, Sano-Martins IS, Cardoso D, Ide Fernandez C, Fernandes JC, Alfred VL, Sandoval MP, Puerto G, Theakston RD, Warrell DA. Snake bites by the jararacuçu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 proven cases in Sao Paulo state, Brazil. *Quart J Med* 90:323-34, 1995.

Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. Outubro, 2001.

[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/incidencia\\_serpente\\_brasil\\_01\\_04\\_2011.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/incidencia_serpente_brasil_01_04_2011.pdf)

[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tabela\\_inc\\_casos\\_serpente\\_01\\_04\\_2011.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tabela_inc_casos_serpente_01_04_2011.pdf)

Mobasher A, Avila J, Cózar-Castellano I, Brownleader MD, Trevan M, Francis MJO, Lamb JF, Martin-Vasallo P. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase Isoenzyme diversity: Comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. *Biosci Rep* 20:51-85, 2000.

Montecucco C, Gutiérrez JM, Lomonte B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. *Cell. Mol. Life Sci.* 65: 2897 – 2912, 2008.

Mora R, Gutiérrez JM, Maldonado A, Valverde B. Calcium plays a key role in the effects induced by a snake venom Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> homologue in a lymphoblastoid cell line. *Toxicon* 47:75-86, 2006.

Mori Y, Niidome T, Fujita Y, Mynlieff M, Dirksen RT, Beam KG, Iwabe N, Miyata T, Furutama D, Furuichi T, Mykoshiha K. Molecular diversity of voltage-dependent calcium channel. *Ann N Y Acad Sci* 707:87-108, 1993.

Moura-da-Silva AM, Desmond H, Laing G, Theakston RD. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. *Toxicon* 29:713-23, 1991.

Patrão-Neto FC, Tomaz MA, Strauch MA, Monteiro-Machado M, Rocha-Junior JR, Melo PA. Dexamethasone antagonizes the *in vivo* myotoxic and inflammatory effects of *Bothrops* venoms. *Toxicon* 2013 (no prelo).

Pereira IC, Barbosa AM, Salvador MJ, Soares AM, Ribeiro W, Cogo JC, Zamuner SR. Anti-inflammatory activity of *Blutaparon portulacoides* ethanolic extract against the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararacussu* venom and isolated myotoxins BthTX-I and II. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*, 15:527-45, 2009.

Pereira Lopes FR, Lisboa BC, Frattini F, Almeida FM, Tomaz MA, Matsumoto PK, Langone F, Lora S, Melo PA, Borojevic R, Han SW, Martinez AM. Enhancement of sciatic-nerve regeneration after VEGF gene therapy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 37:600-12, 2011.

Periasamy M, Kuke S. SERCA pump level is a critical determinant of  $Ca^{2+}$  homeostasis and cardiac contractility. *J Mol Cell Cardiol* 33:1053-63, 2001.

Pikuła S, Epstein L, Martonosi A. The relationship between phospholipid content and  $Ca^{2+}$ -ATPase activity in the sarcoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1196:1-13, 1994.

Pôças ES, Touza NA, Pimenta PH, Leitão FB, Neto CD, da Silva AJ, Costa PR, Noël F. Insights into the mechanism of  $Na^+, K^+$ -ATPase inhibition by 2-methoxy-3,8,9-trihydroxy coumestan. *Bioorg Med Chem* 16:8801-5, 2008.

Popescu LM, Hinescu ME, Musat S, Ionescu M, Pistritzu F. Inositol triphosphate and the contraction of vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 231:167-9, 1986.

Prasad V, Okunade GW, Miller ML, Shull GE. Phenotypes of SERCA and PMCA knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 322:1192-203, 2004.

Putney JW Jr. Calcium signalling: up, down, up, down... what's the point? *Science* 279:191-2, 1998.

Rasmussen H, Barrett PQ. Calcium messenger system: an integrated view. *Physiol Rev* 64:938-84, 1984

Rezende DC. Influência da deleção do gene da óxido nítrico sintase endotelial sobre ATPases e cinases cardíacas. **Dissertação de Mestrado**, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal/UFRJ, 2009.

Rezende DC, Pôças ES, Muzi-Filho H, Cunha VMN, Caricati-Neto A, Jurkiewicz A, Noël F, Quintas LEM. Mechanisms associated to impaired activity of cardiac P-type ATPases in endothelial nitric oxide synthase knockout mice. *J Physiol Biochem* 69:207-14, 2013.

Rodriguez JBR, Muzi-Filho H, Valverde RHF, Quintas LEM, Noël F, Einicker-Lamas M, Cunha VMN. SERCA2 is present in the rat vas deferens and is modulated by  $Ca^{2+}$ /calmodulin protein kinase II-mediated phosphorylation. *Braz J Med Biol Res* 46:227-34, 2013.

Romero-Calvo I, Ocón B, Martínez-Moya P, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustin O, de Medina FS. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem* 401:318-20, 2010.

Santoro ML, Sano-Martins IS, Fan HW, Cardoso JLC, Theakston RDG, Warrel DA. Haematological evaluation of patients bitten by the jararaca, *Bothrops jararaca*, in Brazil. *Toxicon* 51:1440-8, 2008.

Schaffazick N. Ação do veneno de *Bothrops jararacussu* na atividade  $Ca^{2+}$ -ATPásica e expressão das isoformas SERCA1 e SERCA2 no músculo *Extensor digitorum longus*: efeito da heparina. **Dissertação de Mestrado**, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal/UFRJ, 2009.

Schaffazick N, Amaral LS, Fonseca TF, Tomaz MA, Gaban GA, Borges PA, Calil-Elias S, Noël F, Melo PA, Quintas LEM, Cunha VMN. Effect of heparin treatment on the expression and activity of different ion-motive P-type ATPase isoforms from mouse extensor digitorum longus muscle during degeneration and regeneration after *Bothrops jararacussu* venom injection. *Toxicon* 55:52-60, 2010.

Schoot BM, De Pont JJHM, Bonting SL. Studies on (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-activated ATPase. XLII. Evidence for two classes of essential sulfhydryl groups. *Biochim Biophys Acta*, 522:602-13, 1978.

Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. Acidentes por Animais Peçonhentos. Guia de Vigilância Epidemiológica, Caderno 14.

[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve\\_7ed\\_web\\_atual\\_aap.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual_aap.pdf)

Sepúlveda MR, Berrocal M, Marcos D, Wuytack F, Mata AM. Functional and immunocytochemical evidence for the expression and localization of the secretory pathway Ca<sup>2+</sup>-ATPase isoform 1 (SPCA1) in cerebellum relative to other Ca<sup>2+</sup> pumps. *J. Neurochem* 103:1009-18, 2007.

Siqueira-Batista R, Quintas LEM, Martinez AMB, Corrêa AD, Storino RA. Alterações mitocondriais e subcelulares tempo-dependentes após breve oclusão coronariana seguida de reperfusão em coração de rato. *Rev SOCERJ* 7:88-91, 1994.

Szewazyk MM, Pande J, Grover AK. Caloxins: a novel class of selective plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump inhibitors obtained using biotechnology. *Pflugers Arch* 456:255-66, 2008.

Teixeira CFP, Chaves F, Zamunér SR, Fernandes CM, Zuliani JP, Cruz-Hofling MA, Fernandes I, Gutiérrez JM. Effects of neutrophil depletion in the local pathological alterations and muscle regeneration in mice injected with *Bothrops jararaca* snake venom. *Int J Exp Pathol* 86:107-15, 2005.

Teixeira CFP, Cury Y, Moreira V, Picolob G, Chaves F. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. *Toxicon* 54:988-97, 2009.

Teixeira CFP, Landucci ECT, Antunes E, Chacur M, Yury C. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A<sub>2</sub>. *Toxicon* 42:947-62, 2003a.

Teixeira CFP, Zamunér SR, Zuliani JP, Fernandes CM, Cruz-Hofling MA, Fernandes I, Chaves F, Gutiérrez JM. Neutrophils do not contribute to local tissue damage, but play a key role in skeletal muscle regeneration, in mice injected with *Bothrops asper* snake venom. *Muscle Nerve* 28:449-59, 2003b.

Thomas AP, Bird GS, Hajnóczky G, Robb-Gaspers LD, Putney JW Jr. Spatial and temporal aspects of cellular calcium signaling. *FASEB J* 10:1505-17, 1996.

Ticli FK, Hage LI, Cambraia RS, Pereira PS, Magro AJ, Fontes MR, Stábeli RG, Giglio JR, França SC, Soares AM, Sampaio SV. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from *Cordia verbenacea* (*Boraginaceae*): antiserum action potentiation and molecular interaction. *Toxicon* 46:318-27, 2005.

Tokhtaeva E, Clifford RJ, Kaplan JH, Sachs G, Vagin O. Subunit isoform selectivity in assembly of Na,K-ATPase  $\alpha$ - $\beta$  Heterodimers. *J Biol Chem* 287:26115-25, 2012.

Tomaz MA, Fernandes FF, El-Kik CZ, Moraes RA, Calil-Elias S, Saturnino-Oliveira J, Martinez AM, Ownby CL, Melo PA. Increase of the cytotoxic effect of *Bothrops jararacussu* venom on mouse extensor digitorum longus and soleus by potassium channel blockers and by Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase inhibition. *Toxicon* 52:551-8, 2008.

Tupling AR, Bombardier E, Gupta SC, Hussain D, Vigna C, Bloemberg D, Quadrilatero J, Trivieri MG, Babu GJ, Backx PH, Periasamy M, MacLennan DH, Gramolini AO. Enhanced Ca<sup>2+</sup> transport and muscle relaxation in skeletal muscle from sarcolipin-null mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 301:C841-9, 2011.

Utaisincharoen P, Baker B, Tu AT. Binding of myotoxin a to sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase: a structural study. *Biochemistry* 30:8211-6, 1991.

Vangheluwe P, Schermans M, Zádor E, Waelkens E, Raeymaekers L, Wuytack F. Sarcolipin and phospholamban mRNA and protein expression in cardiac and skeletal muscle of different species. *Biochem J* 389:151-9, 2005.

63Vignaud A, Cebrian J, Martelly I, Caruelle JP, Ferry A. Effect of anti-inflammatory and antioxidant drugs on the long-term repair of severely injured mouse skeletal muscle. *Exp Physiol* 90:487-95, 2005.

Villalobos JC, Gutiérrez JM, Lomonte B, Mora R, Angulo Y. Cytotoxicity induced in myotubes by a Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> homologue from the venom of the snake *Bothrops asper*: Evidence of rapid plasma membrane damage and a dual role for extracellular calcium. *Toxicol in Vitro* 21:1382-9, 2007.

Volpe P, Damiani E, Maurer A, Tu AT. Interaction of myotoxin a with the Ca<sup>2+</sup>-ATPase of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys*. 246(1):90-7, 1986.

Vomero VU, Marques MJ, Neto HS. Treatment with an anti-inflammatory drug is detrimental for muscle regeneration at *Bothrops jararacussu* envenoming: an experimental study. *Toxicon* 54:361-3, 2009.

Warrell DA. Snake bite. *Lancet* 375:77-88, 2010.

Wolosker H, Rocha JB, Engelender S, Panizzutti R, De Miranda J, De Meis L. Sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase isoforms: diverse response to acidosis. *Biochem J* 24:285-300, 1997.

Yu SP. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase: the new face of an old player in pathogenesis and apoptotic/hybrid cell death. *Biochem Pharmacol* 66:1601-9, 2003.

Yatime L, Buch-Pedersen MJ, Musgaard M, Morth JP, Winther AML, Pedersen BP, Olesen C, Andersen JP, Vilsen B, Schiott B, Palmgren MG, Moller JV, Nissen P, Fedosova N. P-type ATPases as drug targets: Tools for medicine and science. *Biochim Biophys Acta* 1787:207-20, 2009.

Zádor E, Mendler L, Ver Heyen M, Dux L, Wuytack F. Changes in RNAm levels of the sarcoplasmic/endoplasmic-reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases in the rat soleus muscle regenerating from notexin-induced necrosis. *Biochem J* 320:107-13, 1996.

Zádor E, Owsianik G, Wuytack F. Silencing SERCA1b in a few fibers stimulates growth in the entire regenerating soleus muscle. *Histochem Cell Biol* 135:11-20, 2011.

Zádor E, Wuytack F. Expression of SERCA2a is independent of innervation in regenerating soleus muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 285:853-61, 2003.

Zamunér SR, Fernandes MC, Zuliani JP, Teixeira CFP, Gutiérrez JM. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom: release of proinflammatory cytokines and eicosanoids, and the role of adhesion molecules in leucocyte infiltration. *Toxicon* 46:806-13, 2005.

Zamunér SR, Gutiérrez JM, Muscará MN, Teixeira SA, Teixeira CF. *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes *in vivo*. *Toxicon* 39:1505-13, 2001.

Zhivotovsky B & Orrenius S. Calcium and cell death mechanisms: a perspective from the cell death community. *Cell Calcium* 50:211-21, 2011.

Zychar BC, Dale CS, Demarchi DS, Gonçalves LRC. Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases  $\text{A}_2$  to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice. *Toxicon* 55:227-34, 2010.